Mémoire déposé pour le Prix Gobley — Prix Gobley 1911 (2)

SUR LA PRÉSENCE

DE

L'ACIDE GLYCURONIQUE

ET DE

CERTAINS HYDRATES DE CARBONE

DANS L'URINE NORMALE

PAR

René BERNIER

Docteur de l'Université de Paris (Pharmacie),
Licencié ès sciences,
Ancien Préparateur du Cours de Chimie biologique à l'École supérieure de Pharmacie,
Ancien Interne lauréat des hôpitaux (1er Prix : *Médaille d'Argent*, 1907),
Lauréat de l'École supérieure de Pharmacie
(Prix de l'École : *Médaille d'Or*, 1907; *Médaille d'Argent*, 1906; Prix Laillet, 1907;
Prix *des Travaux de Chimie*, 1905 et 1907, *et de Microbiologie*, 1907).

Couronné

PARIS
IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL
L. MARETHEUX, Directeur
1, RUE CASSETTE, 1

1910

Prix Jolley 1911 (2)

SUR LA PRÉSENCE

DE

L'ACIDE GLYCURONIQUE

ET DE

CERTAINS HYDRATES DE CARBONE

DANS L'URINE NORMALE

(dm) 0 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5

SUR LA PRÉSENCE

DE

L'ACIDE GLYCURONIQUE

ET DE

CERTAINS HYDRATES DE CARBONE

DANS L'URINE NORMALE

PAR

René BERNIER

Docteur de l'Université de Paris (Pharmacie),
Licencié ès sciences,
Ancien Préparateur du Cours de Chimie biologique à l'École supérieure de Pharmacie,
Ancien Interne lauréat des hôpitaux (1er Prix : *Médaille d'Argent*, 1907),
Lauréat de l'École supérieure de Pharmacie
(Prix de l'École : *Médaille d'Or*, 1907; *Médaille d'Argent*, 1906; Prix Laillet, 1907;
Prix *des Travaux de Chimie*, 1905 et 1907, *et de Microbiologie*, 1907).

PARIS
IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL
L. MARETHEUX, Directeur
1, RUE CASSETTE, 1
—
1910

A MON PÈRE

A MA MÈRE

A M. LE PROFESSEUR GRIMBERT

PROFESSEUR A L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE
PHARMACIEN EN CHEF DES HÔPITAUX
DIRECTEUR DE LA PHARMACIE CENTRALE DES HÔPITAUX

Hommage respectueux et reconnaissant.

A M. H. COUSIN

CHEF DES TRAVAUX PRATIQUES A L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE
PHARMACIEN EN CHEF DE L'HÔPITAL COCHIN

A M. LE DOCTEUR QUÉNU

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
CHIRURGIEN DE L'HÔPITAL COCHIN

A M. LE DOCTEUR WIDAL

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
MÉDECIN DE L'HÔPITAL COCHIN

A M. LE DOCTEUR FAURE

PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
CHIRURGIEN DE L'HÔPITAL COCHIN

A M. LE DOCTEUR DUVAL

PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
CHIRURGIEN DES HÔPITAUX

SUR LA PRÉSENCE

DE

L'ACIDE GLYCURONIQUE

ET DE CERTAINS HYDRATES DE CARBONE

DANS L'URINE NORMALE



INTRODUCTION

Les hydrates de carbone de l'organisme ont été l'objet d'innombrables travaux. Leur étude a été faite par des auteurs éminents, et je crains de paraître téméraire en cherchant après eux à éclaircir quelques points encore obscurs de leur histoire.

L'idée de ce travail m'a été suggérée par l'étude d'une épreuve fort employée en clinique depuis quelques années et connue sous le nom de réaction de Cammidge. Cette réaction repose sur la formation, après hydrolyse de l'urine, d'une osazone d'origine inconnue. La détermination du corps qui lui donne naissance a été le but de mes recherches.

J'ai tout d'abord étudié les divers hydrates de carbone de l'organisme susceptibles de donner des combinaisons avec la phénylhydrazine. J'ai pu ensuite identifier avec l'acide glycuronique le composé générateur d'osazone et j'ai cru intéressant d'étendre sa recherche aux autres liquides de l'organisme.

La glycurosazone qui se forme ainsi dans toutes les urines après hydrolyse est toujours accompagnée d'une petite quantité de glucosazone. J'ai cherché à déterminer l'origine de ce corps et j'ai été ainsi amené à étudier à nouveau la question du glucose normal de l'urine et à envisager la possibilité de la présence constante du saccharose dans ce liquide.

Ces travaux m'ont permis d'élucider quelques points encore très discutés, tels que le pouvoir réducteur normal de l'urine et sa déviation lévogyre. J'ai examiné en outre les causes d'erreurs apportées dans la recherche du glucose dans l'urine par la présence d'acide glycuronique.

J'ai enfin déterminé la valeur diagnostique de la réaction de Cammidge.

Ce travail a été exécuté dans le laboratoire de M. le professeur Grimbert qui, après m'avoir guidé de ses conseils pendant mes premières années d'internat, m'a fait le grand honneur de m'appeler à remplir auprès de lui les fonctions de Préparateur du Cours de Chimie biologique. Sous la direction de ce Maître, j'ai pu mener à bien des recherches souvent délicates. Je le prie de croire à toute ma reconnaissance.

J'exprime à M. Cousin, pharmacien en chef de l'hôpital Cochin, toute ma gratitude pour la grande bienveillance qu'il m'a toujours montrée et l'aide complaisante qu'il m'a souvent accordée.

Les quelques années que j'ai passées dans les hôpitaux m'ont grandement facilité l'exécution de ce travail en me permettant l'étude de nombreux cas pathologiques.

J'ai eu l'honneur d'être l'interne de M. le professeur Quénu, de M. le professeur agrégé Widal, de M. le professeur agrégé Faure, de M. le professeur agrégé Duval. Je remercie vivement ces Maîtres de la sympathie qu'ils m'ont constamment témoignée.

Je suis également heureux d'adresser mes remercîments à M. le professeur H. Gautier qui, à plusieurs reprises, a bien voulu s'intéresser à moi; à M. le professeur Lebeau, qui a accueilli favorablement ce travail et à M. le professeur agrégé Hérissey, dont les conseils m'ont été souvent très utiles.

Le présent travail est divisé en quatre parties:

1° Les hydrates de carbone de l'organisme;
2° L'acide glycuronique dans l'organisme ;
3° Le saccharose et le glucose dans l'urine normale ;
4° Applications diverses des résultats précédents.

PREMIÈRE PARTIE

HYDRATES DE CARBONE DE L'ORGANISME

CHAPITRE PREMIER

Emploi de la phénylhydrazine dans l'étude des sucres.

Depuis l'époque où elle fut découverte par Fischer[1] la phénylhydrazine a pris une importance considérable en chimie organique.

Ses multiples réactions, effectuées pour la plupart avec une grande facilité, en ont fait un réactif précieux pour la caractérisation de certaines fonctions chimiques. La série aldéhydique en particulier lui est redevable de l'identification de nombreux composés nouveaux que leur combinaison hydrazinique a permis de déterminer avec certitude. Les réactions si nettes obtenues dans l'action de la phénylhydrazine sur les composés du groupe des aldéhydes alcools ont rendu ce réactif indispensable dans l'étude des sucres, de leurs générateurs et de leurs dérivés.

La phénylhydrazine réagissant sur les sucres réducteurs à la température ordinaire attaque la fonction aldéhydique ou cétonique en donnant naissance à une hydrazone d'après l'équation :

$$CH^2OH - (CHOH)^4 - CHO + AzH^2 - AzH\ (C^6H^5) =$$
$$CH^2OH - (CHOH)^4 - CH - Az = AzH\ (C^6H^5) + H^2O$$

La plupart des hydrazones sont des corps cristallisés, incolores ou jaunâtres, solubles dans l'eau, actifs sur la lumière polarisée.

Si au cours de la réaction précédente la température s'élève ou si on opère au bain-marie en présence d'un léger excès d'acide acétique, on a formation d'une nouvelle combinaison résultant de

---

1. E. Fischer. *Liebig's Ann. Chem.*, **190**, 71 (1877-78).

la soudure d'une seconde molécule de phénylhydrazine sur un atome de carbone voisin de la fonction aldéhydique (FISCHER)[1].

Ces combinaisons portent le nom de phénylosazones ou diphénylhydrazones et la réaction est la suivante :

$$CH^2OH - (CHOH)^3 - CHOH - CHO + 2\ AzH^2 - AzH\ (C^6H^5) =$$
$$CH^2OH - (CHOH)^3 - \underset{\underset{\displaystyle Az - AzH\ (C^6H^5)}{\|}}{C} - CH = Az - AzH\ (C^6H^5) + 2H^2O + 2H$$

Les deux atomes d'hydrogène mis en liberté proviennent de l'oxydation préalable de la fonction alcoolique attaquée. En réalité, ils réagissent sur la phénylhydrazine en excès pour la transformer en aniline et en ammoniaque.

Les osazones sont nettement cristallisées et quelques-unes affectent des formes caractéristiques. L'examen microscopique des cristaux d'osazones peut fréquemment donner d'utiles renseignements sur leur nature, bien que les formes cristallisées varient à l'infini suivant la concentration des liqueurs, la nature du dissolvant, le milieu de cristallisation, la lenteur du refroidissement, etc.

La solubilité des osazones est également un caractère précieux pour leur diagnose. Plus ou moins solubles dans l'eau bouillante, elles le sont extrêmement peu dans l'eau froide, ce qui permet de les obtenir dans des liqueurs très diluées. Elles sont plus solubles dans l'alcool et dans l'acétone, insolubles dans la benzine et dans l'éther. L'acide acétique les dissout facilement et permet ainsi de déterminer leur pouvoir rotatoire presque toujours lévogyre[2].

« Le point de fusion des osazones n'est pas net, dit MAQUENNE[3], et peut même varier de près de 20° suivant le temps que la matière met à fondre. Les nombres donnés à ce sujet par FISCHER sont relatifs à une durée de chauffe totale de trois minutes environ. Il est indispensable, pour comparer les points de fusion de deux osazones, de les observer dans les mêmes conditions expérimentales. » Aussi, est-il beaucoup exact de prendre le point de fusion instantanée à l'aide du bloc MAQUENNE[4] suivant la méthode donnée par G. BERTRAND et précisée par MAQUENNE[5]. « Alors que la tem-

1. FISCHER. *Ber. chem. Ges*, **21**, 984 (1888).
2. FISCHER et TAFEL. *Ber. chem. Ges.*, **20**, 2568 (1887).
3. L. MAQUENNE. *Les sucres et principaux dérivés*, Paris 1900, p. 257.
4. MAQUENNE. *Bull. Soc. Chim.* (2), **48**, 771 (1887).
5. MAQUENNE. *Bull. Soc. Chim.* (3), **31**, 471, (1904).

pérature monte, on projette de temps en temps sur la surface du métal une parcelle (1/10 de milligramme environ) du corps étudié en ne l'y laissant séjourner qu'un instant et cela jusqu'à ce que la fusion se produise d'une manière brusque. On laisse alors refroidir et on continue la même manœuvre pendant que la température s'abaisse... Pour les matières instables le point de fusion instantanée, déterminé comme il vient d'être dit, n'est plus égal à celui qu'on observe en tube capillaire ; tandis que ce dernier varie avec le temps de chauffe et s'abaisse d'autant plus que celle-ci a été moins rapide, le premier reste fixe et par suite nous paraît représenter mieux que les autres une véritable constante physique. »

Les nombreux points de fusion nécessités par ce travail, ayant été tous déterminés en suivant scrupuleusement la technique qui vient d'être décrite, j'ai cru utile de reproduire textuellement les remarques de Maquenne et pense avoir ainsi évité toute équivoque.

Mettant à profit les propriétés si intéressantes des osazones, von Jaksch [1] le premier proposa leur emploi pour la recherche du glucose dans l'urine. Cette méthode servit également à caractériser le lactose et à le différencier du glucose grâce aux aspects, aux solubilités et aux points de fusion très différents des deux osazones. Mais on remarqua bientôt que les liquides de l'organisme contenaient d'autres principes réducteurs capables d'entrer en réaction avec la phénylhydrazine et de fournir des combinaisons cristallisées, soit directement, soit après hydrolyse. Quelques osazones ainsi formées ont été plus ou moins identifiées avec des corps déjà connus et leur caractérisation a donné lieu à un grand nombre de travaux.

La recherche d'hydrates de carbone encore inconnus dans les liquides de l'organisme, et en particulier dans l'urine, a suscité également de nombreux mémoires et amené la découverte de quelques corps nouveaux dont l'individualité est encore, pour quelques-uns tout au moins, très problématique.

Nous passerons rapidement en revue les travaux auxquels ces recherches ont donné lieu.

---

1. Von Jaksch. *Zeit. f. klin. Medicin* (1886), 20.

CHAPITRE II

Étude des Composés de l'organisme susceptibles de réagir sur la phénylhydrazine, directement ou après hydrolyse.

I. — Gomme animale.

Landwehr[1], le premier, a signalé dans l'organisme animal un hydrate de carbone voisin des dextrines qu'il aurait extrait des glandes salivaires, de l'urine, du lait, et qu'il aurait obtenu comme produit de dédoublement de la mucine sous-maxillaire et de la métalbumine.

Baisch[2], quelques années plus tard, aurait caractérisé une gomme animale dans l'urine et ses travaux ont été confirmés par Lemaire[3] et par Pavy et Siau[4]. Von Alfthan[5] a trouvé ce produit en plus grande abondance dans l'urine diabétique que dans l'urine normale.

Ritthausen[6] en partant du lait, Schutzenberger[7] en traitant les glandes mammaires, Loebisch avec les tendons de muscles, ont obtenu des hydrates de carbone qui semblent analogues à la gomme animale de Landwehr.

On peut en dire autant, semble-t-il, de l'acide cryptophanique extrait de l'urine humaine par Thudichum[8], de l'hydrate de carbone obtenu par Pouchet[9] avec les poumons d'un phtisique, de l'achroglycogène retiré par Landwehr de l'escargot, et des produits

---

1. H. A. Landwehr. *Zeit. phys. Chem.*, **6**, 74 (1882) ; **8**, 122 (1883-84); **9**, 368 (1885). *Ber. chem. Ges.*, **16**, 2935 (1883). *Pflüger's Archiv.*, **39**, 193 et **40**, 21. *Centralb. f. med. Wissensch.* (1885), n° 21, 369.
2. Baisch. *Zeit. phys. Chem.*, **14**, 339 (1890) ;**19** , 362 (1894) ; **20**, 249 (1894-95).
3. Lemaire. *Zeit. phys. Chem.*, **21**, 442 (1895-1896).
4. Pavy et Siau. *Journal of physiology*, **26**, 282.
5. Von Alfthan. *D. med. Woch.* (1900), 497.
6. Ritthausen. *Journal für pratische Chem.*, N.F. **15**, 329 (1877).
7. Schutzenberger. *Gaz. méd. de Paris* (1879), n° 2.
8. Thudichum. *Centralbl. f. med. Wiss.* (1870), 195, 205, 322.
9. Pouchet. *C. R. Acad. des Sciences*, **96**, 1506 et 1601 (1883).

obtenus par Fraenkel dans l'hydrolyse de certaines matières albuminoïdes.

Extraction de la gomme animale de l'urine. — 1° On alcalinise fortement avec la lessive de soude une urine riche en substances gommeuses et on filtre. On verse lentement dans la liqueur filtrée une solution de sulfate de cuivre qui précipite la gomme animale à l'état de combinaison métallique. Le précipité est recueilli, lavé et dissous dans la plus petite quantité possible d'acide chlorhydrique concentré et la solution obtenue additionnée de trois volumes d'alcool qui précipite la gomme animale. Le précipité floconneux est lavé à l'alcool, dissous dans l'eau, reprécipité à nouveau et séché dans le vide sulfurique (Landwehr[1]).

Ce procédé donne de mauvais rendements. Freund[2] l'a modifié en faisant la précipitation de la gomme en milieu ammoniacal.

On peut aussi séparer directement la gomme de l'urine par l'alcool, recueillir le précipité, le dissoudre dans l'eau et le traiter par le sulfate de cuivre en suivant la technique précédente.

2° Baisch[3] a préparé la gomme animale en traitant les urines par le chlorure de benzoyle en milieu alcalin. Lemaire[4] a repris cette technique en la modifiant légèrement.

L'urine rendue alcaline par la soude est filtrée, et à 100 cm^3 du filtrat on ajoute 40 cm^3 de solution de soude à 12 °/₀ et 5 cm^3 de chlorure de benzoyle. Le mélange est agité une heure en le refroidissant, jusqu'à disparition presque complète de l'odeur de chlorure de benzoyle. Le précipité est recueilli et lavé à l'eau, puis séché dans le vide sulfurique. 100 cm^3 d'urine auraient fourni à Lemaire 0^{gr},254 d'éther sec, d'où l'on peut facilement régénérer la gomme animale par saponification. Alfthan a pu extraire de l'urine normale de plusieurs personnes des proportions de gomme variant de 1 gr. 50 à 5 gr. 10. Luther[5] estime à 0^{gr},136 °/₀ la quantité d'hydrates de carbone non fermentescibles dans l'urine normale.

Propriétés. — La gomme animale se présente sous forme d'une poudre farineuse blanche, sans odeur ni saveur.

Séchée dans le vide sulfurique elle répond à la formule

1. Landwehr. *Zeit. phys. Chem.* 8, 122 (1883-84).
2. Freund. *Centralbl. f. phys.*, 6, 346 (1892).
3. Baisch. *Loc. cit.*, p. 12.
4. Lemaire. *Zeit. phys. Chem.*, 21, 442 (1895-96).
5. Luther. Diss. (1890), 42.

$C^{12}H^{20}O^{10},2H^2O$. A 120°, elle perd son eau d'hydratation. Elle se dissout dans l'eau en donnant une liqueur jaunâtre et opalescente, moussant fortement par l'agitation. Elle est insoluble dans l'alcool et l'éther. La solution aqueuse précipite par l'acide acétique, par le sulfate d'ammoniaque à saturation, et non par le sulfate de soude. Elle est faiblement dextrogyre, et ne réduit pas la liqueur de Fehling au bout de dix minutes, mais seulement par un chauffage prolongé. Elle donne des combinaisons insolubles avec les alcalis, les terres alcalines et les oxydes métalliques. Elle ne se colore pas par l'iode, ce qui la distingue du glycogène.

La salive, la diastase, le suc pancréatique, la levure de bière sont sans action sur elle.

Par ébullition avec les acides dilués, elle donne naissance à une matière sucrée, non cristallisable et non fermentescible, réduisant la liqueur de Fehling. Lemaire[1], en traitant la gomme animale par l'acide sulfurique suivant les indications de Baisch, a obtenu un liquide coloré en brun qui, chauffé avec du chlorhydrate de phénylhydrazine et de l'acétate de soude, donne une osazone nettement cristallisée en épis ou en faisceaux. Cette osazone, après purification par dissolution dans l'alcool et reprécipitation par l'eau, fond à 203°-204° et est considérée comme de la glucosazone.

Cependant quelques auteurs pensent que l'hydrolyse des polysaccharides retirés de l'urine et des autres liquides de l'organisme fournit non pas du glucose, mais de la glucosamine, qui donne avec l'acétate de phénylhydrazine la même osazone que le glucose.

Des travaux récents, en particulier celui de Folin[2], sont venus mettre en doute l'existence de la gomme animale. Cet auteur a en effet trouvé jusqu'à 12 °/₀ d'azote dans un produit préparé suivant les indications de Landwehr.

II. — Glucosamine.

La glucosamine ou chitosamine a été découverte dans les produits d'hydrolyse de la chitine des crustacés et des champignons par Ledderhose[3]. Plusieurs auteurs l'ont obtenue dans l'action des

1. Lemaire. *Zeit. phys. Chem.*, 21, 442 (1895-96).
2. Folin. *Zeit. phys. Chem.*, 23, 347 (1897).
3. Ledderhose. *Zeit. phys. Chem.*, 2, 213 (1878-79) et 4, 139 (1880).

acides sur diverses matières albuminoïdes parmi lesquelles on peut citer les mucines et mucoïdes (MULLER[1]), l'acide chondroïtine-sulfurique (SCHMIEDEBERG[2]), etc.

La glucosamine n'a pas été caractérisée à l'état de liberté dans les liquides de l'organisme.

Préparation. — On la prépare en traitant les matières protéiques par de l'acide chlorhydrique au 1/10 pendant quelques heures. La solution concentrée dépose par refroidissement des cristaux de chlorhydrate de glucosamine. On peut les purifier par cristallisations répétées ou en les faisant passer à l'état d'éther benzoïque que l'on saponifie ensuite en tube scellé par de l'acide chlorhydrique.

Propriétés. — La glucosamine et ses sels sont solubles dans l'eau, peu solubles dans l'alcool, insolubles dans l'éther et le chloroforme. Ils réduisent la liqueur de Fehling, possèdent un pouvoir rotatoire dextrogyre et ne fermentent pas. Leurs hydrazones et osazones sont identiques à celles du glucose.

III. — JÉCORINES.

L'étude des Jécorines est à peine ébauchée; aussi leur constitution qui semble fort complexe est-elle peu connue. On les regarde généralement comme des combinaisons d'hydrates de carbone et de lécithines.

Elles ont été d'abord extraites du foie du cheval (DRECHSEL[3]), puis d'un grand nombre de tissus et d'organes animaux.

P. MAYER[4] a obtenu une jécorine du sang de cheval et du sang de chien, LETSCHE[5] du sérum de cheval, OTOLSKI[6] de la moelle des os.

D'après HENRIQUES[7], BING[8]. JACOBSEN[9], et BALDI[10], le pouvoir réducteur du sang est dû non seulement au glucose, mais encore

1. MULLER. *Zeit. f. Biologie*, **42**, 468.
2. SCHMIEDEBERG. *Zeit. phys. Chem.*, **34**, 353 (1901-02).
3. DRECHSEL. *Journal prakt. Chem.*, **33**, 425 (1877).
4. MAYER (P.). *Biochem. Zeit.*, **4**, 545 (1907).
5. LETSCHE. *Zeit. phys. Chem.*, **53**, 31 (1907).
6. OTOLSKI. *Biochem. Zeit.*, **4**, 147 (1907).
7. VALDEMAR HENRIQUES. *Zeit. phys. Chem.*, **23**, 244 (1897).
8. BING. *Archiv. f. physiol.*, **9**, 336 (1896).
9. JACOBSEN. *Archiv. f. physiol.*, **6**, 262 (1895).
10. BALDI. *Archiv. f. Anat. et Physiol.* (1887).

à la jécorine qu'on peut extraire grâce à sa solubilité dans l'éther aqueux alors que le glucose y est insoluble (DRECHSEL [1]).

Propriétés. — Les jécorines sont insolubles dans l'alcool, solubles dans l'eau et dans l'éther.

La solution aqueuse réduit la liqueur de Fehling et l'azotate d'argent ammoniacal. Elle fermente par la levure de bière.

L'hydrolyse des jécorines par l'acide chlorhydrique dilué donne un sucre qu'on a identifié avec le glucose, tandis que l'hydrolyse par l'eau de baryte met en liberté les constituants des lécithines.

PAVY et SIAU [2], après traitement de l'extrait de sang par l'éther aqueux, prétendent n'avoir pu obtenir la jécorine décrite par les auteurs cités plus haut.

IV. — LACTOSE.

La présence d'un sucre réducteur dans l'urine des accouchées a été signalée d'abord par CLAUDE BERNARD, puis par BLOT et de SINETY. Plus tard des discussions s'élevèrent sur la nature de ce principe réducteur, que les uns considéraient comme du glucose et les autres comme du lactose, tandis que des auteurs comme MAC-CAUN et TURNER affirmaient la coexistence des deux sucres.

LEDUC démontra par la suite que toute femme ayant du lactose non utilisé, soit par suppression de la lactation, soit par obstacle à l'allaitement, l'élimine dans ses urines dont le pouvoir réducteur doit être presque entièrement, sinon exclusivement attribué à ce sucre.

PORCHER [3] a démontré que le lactose apparaissait dans l'urine même avant l'accouchement, mais seulement dans la proportion de 1 à 2 gr., alors que cette même urine peut en contenir, *post partum*, jusqu'à 7 et 8 gr. La lactosurie est de règle chez toutes les femelles des mammifères.

Recherche. — 1° On a conseillé la réaction de RUBNER qui consiste à dissoudre 3 gr. d'acétate de plomb dans 10 cm³ d'urine. On filtre et on porte à l'ébullition. L'addition de quelques gouttes d'ammoniaque produit une coloration jaune qui passe ensuite à l'orange, puis au rouge brique. Cette réaction serait sensible

1. DRECHSEL. *Zeit. f. Biolog.*, **33**, 85 (1896).
2. PAVY et SIAU. *Journal of physiology.*, **26**, 282.
3. PORCHER. *Sur la Lactosurie* (collection Critzmann). Paris, 1902.

à 0 gr. 02 p. 100. Elle n'est nullement caractéristique du lactose, d'autres sucres, parmi lesquels le glucose, produisant dans les mêmes conditions une coloration aussi intense.

2° Le lactose est un sucre infermentescible, aussi quelques auteurs ont-ils cru pouvoir le distinguer du glucose en additionnant l'urine de levure qui, après quarante-huit heures, a complétement fait disparaître ce dernier. Il suffit d'examiner à nouveau le pouvoir réducteur et le pouvoir rotatoire de l'urine.

3° La meilleure méthode pour caractériser le lactose est à coup sûr l'obtention de son osazone. Bierry [1] a précisé la technique à suivre et donné le moyen de séparer facilement la lactosazone de la glucosazone.

L'urine est déféquée au nitrate mercurique, réactif de Patein et Dufau [2], et le mercure éliminé par le zinc ou plus simplement par une goutte de phénylhydrazine; 20 cm³ de liqueur filtrée sont additionnés de 1 cm³ d'une solution d'acétate de soude à 25 °/₀, 1 cm³ 5 d'acide acétique et 1 cm³ de phénylhydrazine, et le mélange porté une heure au bain-marie.

La lactosazone est soluble dans l'eau bouillante et cristallise par refroidissement. On la recueille sur un filtre et on la traite par de l'acétone contenant la moitié de son volume d'eau qui la dissout sans dissoudre sensiblement la glucosazone. L'acétone, par évaporation à l'air libre, abandonne des cristaux affectant la forme d'oursins qui peuvent être purifiés par une nouvelle dissolution dans l'eau bouillante. Les cristaux se forment à nouveau par refroidissement et fondent à 213°-215° au Bloc Maquenne.

La solubilité de la lactosazone dans l'alcool méthylique peut aussi la distinguer de la glucosazone qui est insoluble dans ce dissolvant.

V. — Maltose.

Von Ackeren [3] signala le premier le maltose dans les urines d'un malade atteint de cancer de l'estomac, et l'isola à l'état de maltosazone. Le Nobel confirma ces expériences.

Lépine et Boulud [4] conclurent à nouveau à la présence de ce sucre dans l'urine humaine en basant leurs observations sur la

1. Bierry (H.). *C. R. Soc. Biol.*, **55**, 478 (1903).
2. Patein et Dufau. *C. R. Ac. des Sciences*, **128**, 375 (1899).
3. Von Ackeren. *Berliner klin. Wochenschr.*, (1889), n° 14.
4. Lépine et Boulud. *C. R. Ac. des Sciences*, **132**, 610 (1901).

diminution de la déviation et l'augmentation du pouvoir réducteur après hydrolyse. Ces mêmes auteurs auraient caractérisé le maltose transitoirement mélangé au glucose dans l'urine des chiens privés de pancréas. Ils l'auraient en outre, dans des cas très rares, rencontré dans le sang de ces animaux.

Les caractères déjà décrits et l'osazone soluble dans l'éther leur ont permis de conclure à sa présence[1]? Lépine et Boulud[2] ont aussi voulu démontrer l'existence assez fréquente du maltose dans le foie des chiens, même nourris exclusivement de viande, quelques heures après la mort. Le maltose coexisterait souvent dans cet organe avec l'acide glycuronique, ainsi que cela se produit parfois dans l'urine[3].

Recherche. — Le dosage du sucre dans l'urine donne des résultats différents au polarimètre et à la liqueur de Fehling. La déviation étant plus accentuée que ne semble l'indiquer la réduction, on doit soupçonner la présence du maltose et hydrolyser ce sucre en milieu chlorhydrique pendant deux heures à 100°. Si l'urine contient du maltose, il aura été dédoublé en deux molécules de glucose, la déviation polarimétrique aura sensiblement diminué, tandis que le pouvoir réducteur se sera accru.

Lépine et Boulud ont pu ainsi trouver dans l'urine d'une femme de 1 gr. 93 à 2 gr. 78 de maltose.

Le procédé de ces auteurs pour la caractérisation du maltose dans le foie repose sur la précipitation préalable du glycogène par l'alcool et la formation des osazones des autres hydrates de carbone. La glucosazone et la maltosazone sont ensuite séparées par traitement à l'éther qui laisse insoluble la glucosazone et abandonne par évaporation un résidu qui, recristallisé dans l'eau chaude, fond à 200°.

Grimbert[4] fait à juste titre remarquer que la maltosazone est insoluble dans l'éther aussi bien que la glucosazone, et que les seuls moyens efficaces de séparation des deux corps sont le traitement par l'eau bouillante ou par l'acétone diluée de son volume d'eau qui dissout la maltosazone et non la glucosazone. Ces observations diminuent singulièrement la valeur des recherches précédentes.

1. Lépine et Boulud. *C. R. Ac. des Sciences*, **133**, 138 (1901).
2. Lépine et Boulud. *C. R Soc. de Biologie*, **53**, 1061 (1901).
3. Lépine et Boulud. *Revue de médecine* (1901), 636-637.
4. Grimbert. *Journal Pharm. et Chimie* (6), **17**, 225 (1903).

VI. — Isomaltose.

L'isomaltose aurait été trouvé en faible quantité dans l'urine normale par Baisch [1] et Lemaire [2], et dans l'urine diabétique par Rosin [3] et Alfthan [4]. Pavy et Siau [5], en confirmant les travaux précédents, l'ont signalé dans le sang et dans les muscles. Bien que de nombreuses discussions se soient élevées à ce sujet [6], l'isomaltose semble encore se former dans la décomposition de l'amidon et du glycogène par les acides [7-8], et les diastases du malt, de la salive et du suc pancréatique; ce qui expliquerait sa présence dans l'organisme (Külz et Vogel [9], Röhmann [10], Lintner et Düll [11]).

Caractérisation. — Tous les auteurs qui se sont occupés de cette question ont caractérisé l'isomaltose par son osazone après l'avoir extrait à l'état d'éther benzoïque suivant la méthode de Baumann [12] modifiée par Baisch et Lemaire.

L'urine est traitée par le chlorure de benzoyle en milieu alcalin d'après la technique décrite page 13. L'éther obtenu est lavé à l'eau distillée et dissous dans de l'alcool contenant de l'éthylate de sodium (7 gr. de sodium pour 300 cm³ d'alcool absolu) refroidi à 5°. On laisse en contact pendant quarante minutes pour obtenir la saponification de l'éther benzoïque. On neutralise par de l'acide sulfurique étendu qui met en liberté de l'acide benzoïque, facile à enlever par agitation avec de l'éther. On évapore l'alcool à siccité en ayant soin de séparer au cours de cette opération le sulfate de soude qui cristallise et on reprend par l'eau distillée.

La solution aqueuse contient du glucose et de l'isomaltose; on se débarrasse du premier par fermentation de quarante-huit heures, à l'aide de la levure de bière qui n'attaque pas l'isomaltose [13]. On obtient une liqueur dextrogyre donnant avec le chlorhydrate de

---

1. Baisch. *Zeit. phys. Chem.*, **19**, 335 (1894), et **20**, 249 (1895).
2. Lemaire. *Zeit. phys. Chem.*, **21**, 442 (1895-1896).
3. Rosin. *Deutsche med. Wochensch.* (1900), 497.
4. Alfthan. *Deutsche med. Wochensch.* (1900), 499, et *Ing. Diss. Helsingfors* (1900).
5. Pavy et Siau. *Journal of Physiology*, **26**, 282.
6. Brown et Morris. *Journal of the chemical Society*, **67**, 709 (1895).
7. Scheibler et Mittelmeier. *Ber. chem. Ges.*, **23**, 3075, (1890).
8. Lintner et Cremer. *Zeit. f. Biol.*, **31**, 181 (1894.)
9. Külz et Vogel. *Zeit. f. Biol.*, **31**, 108 (1894).
10. Röhmann. *Centralbl. med. Wissens.* (1893), 849.
11. Lintner et Düll. *Ber. chem. Ges.*, **26**, 2533 (1893).
12. Baumann. *Ber. chem. Ges.*, **19**, 3220 (1886).
13. Fischer. *Ber. chem. Ges.*, **28**, 3024 (1895).

phénylhydrazine et l'acétate de soude une osazone cristallisée en aiguilles jaunes, groupées en rosettes et fondant à 150°-151°. Cette osazone correspond à celle décrite par Fischer[1] comme étant de l'isomaltosazone et pour laquelle il a donné le point de fusion de 150°-153°.

Lemaire écarte l'hypothèse de la présence des pentoses signalés par Salkowski[2] et dont l'osazone fondait à 157°-159°. Il s'appuie sur la différence de point de fusion des deux osazones et leur teneur en azote qui est de 17 gr. 07 °/₀ pour la pentosazone et de 10 gr. 77 °/₀ pour l'isomaltosazone. Il a déterminé par la méthode de Kjeldahl la teneur en azote de l'osazone extraite de l'urine et a obtenu des chiffres voisins de ceux de l'isomaltosazone.

Sans prendre parti dans la discussion qui s'est élevée au sujet de la formation de l'isomaltosazone dans la décomposition diastasique de l'amidon, je dirai seulement que la détermination de la teneur en azote des osazones par la méthode de Kjeldahl ne me semble fournir que des résultats approchés.

J'ai utilisé cette méthode avec diverses osazones et en particulier avec de la glucosazone présentant toutes les garanties de pureté et ai constaté dans chaque opération des pertes en azote relativement élevées.

VII. — Saccharose.

Un cas de saccharosurie a été signalé par Bretet en 1897.

En Allemagne, Smolenski[3] a décrit un second cas, dans lequel il a pu isoler le saccharose cristallisé. Il en a conclu un peu trop hâtivement que ce sucre pouvait être la substance génératrice de la réaction de Cammidge que nous aurons l'occasion d'étudier par la suite.

Caractérisation. — La recherche du saccharose est basée sur ses propriétés. C'est un sucre non réducteur, doué d'un pouvoir rotatoire dextrogyre. Il est dédoublable par les acides et l'invertine en glucose et lévulose. Ses solutions ainsi hydrolysées deviennent réductrices et leur pouvoir rotatoire change de sens.

La recherche et le dosage du saccharose en présence du glucose

1. Fischer. *Ber. chem. Ges.*, **23**, 3687 (1890).
2. Salkowski. *Zeit. phys. Chem.*, **27**, 507 (1899).
3. Smolenski. *Zeit. phys. Chem.*, **60**, 119 (1909).

s'effectuent très facilement par la détermination du pouvoir réducteur ou de la déviation polarimétrique avant et après hydrolyse.

VIII. — Glucose.

Le glucose est le sucre qui confère à l'urine diabétique son pouvoir réducteur. Son identité mise en doute par Landolph[1] a été démontrée par Le Goff[2]. Dans le sang, Hedon[3] a discuté sa présence qui a été de nouveau affirmée par Hanriot[4] et de nombreux auteurs.

Il est d'ailleurs facile de le caractériser par son osazone dans presque tous les liquides et organes du corps humain, muscles, sang, liquide céphalo-rachidien, liquides pathologiques, etc. Il semble ne pas exister dans l'urine normale et ne traverser le rein que lorsque sa proportion dans le sang augmente sensiblement. Cependant la présence dans ce liquide de traces de glucose est presque admise depuis les recherches de Baisch[5]. J'étudierai plus longuement ce sujet au cours de ce travail (Voir page 79).

IX. — Lévulose.

C'est bien rarement que l'on a pu observer la présence du lévulose dans l'urine. Il a été signalé par Külz[6] et par Cotton[7], mais les quelques observations détaillées que l'on possède sont dues à Zimmer et Czapeck (1876), à Seegen (1894), à P. Marie et Robinson (1896).

Recherche. — L'urine qui contient du lévulose réduit la liqueur de Fehling et les dosages du sucre par la liqueur cupro-potassique et le polarimètre sont en désaccord.

La solution examinée dévie à gauche si le lévulose est seul en cause ou donne par le calcul un chiffre de sucre très inférieur à celui obtenu par la liqueur de Fehling si la lévulosurie est accompagnée de glycosurie.

---

1. Landolph. *C. R. Ac. des Sciences*, **123**, 1301 (1896); **125**, 118 (1897); **127**, 765 (1898).
2. Le Goff. *Journal Pharm. et Chimie* (6) **9**, 29 (1899).
3. Hedon. *C. R. Soc. de Biol.*, **50**, 510 (1898).
4. Hanriot. *C. R. Soc. de Biol.*, **50**, 543 (1898).
5. Baisch. *Zeit. phys. Chem.*, **23**, 193 et 255 (1897).
6. Külz. *Zeit. f. Biol.*, **27**, 228.
7. Cotton. *Bull. Soc. chim.* (2), **33**, 546 (1880).

Il ne faut pas oublier d'ailleurs que l'acide β-oxybutyrique qui accompagne souvent les urines diabétiques possède un pouvoir rotatoire lévogyre assez intense. Il en est de même des conjugués glycuroniques qui apparaissent dans l'urine à la suite de l'ingestion de très nombreux médicaments et dont il est parfois difficile de se débarrasser, ces composés n'étant pas précipitables par l'acétate neutre de plomb ainsi que l'indiquent certains auteurs, ni même par le sous-acétate pour certains d'entre eux (Huppert[1]). Pour conclure à la présence du lévulose dans une urine, il faudra donc s'assurer que la substance qui produit la déviation lévogyre est fermentescible et fournit avec la phénylhydrazine de la phénylglucosazone facile à identifier.

De plus, les solutions devront donner la réaction de Selivanoff[2] dont la spécificité a été et est encore d'ailleurs fort discutée.

Le réactif de Selivanoff se prépare en dissolvant 2 gr. de résorcine dans 100 cm³ d'eau distillée et en ajoutant un 1/2 cm³ d'acide sulfurique. On mélange à parties égales l'urine non déféquée, le réactif et de l'acide chlorhydrique et on porte au bain-marie bouillant cinq minutes. L'urine contenant du lévulose se colore en rouge foncé et par refroidissement abandonne un précipité qui est soluble dans l'alcool en le colorant en rouge et en donnant au spectroscope en liqueur étendue une bande dans le vert, entre les raies E. et G. (Rosin[3]).

On ne doit pas tenir compte d'une simple coloration rouge qui se produit avec la plupart des urines et compter seulement comme positive toute réaction accompagnée de trouble. Le réactif de Selivanoff donne une réaction identique avec le saccharose.

Enfin, il semble qu'il pourrait être intéressant de rechercher le lévulose à l'aide de la méthylphénylhydrazine qui, d'après Neuberg[4] et Ofner[5], donne une osazone avec le lévulose, tandis qu'elle fournit dans les mêmes conditions une hydrazone avec le glucose. Neuberg et Strauss[6] ont appliqué cette réaction à la recherche du lévulose dans les liquides de l'organisme et après de nombreuses purifications ont obtenu une méthyphénylosazone fondant à 158°-

1. Huppert. *Analyse des Harns* (1898), 197.
2. Selivanoff. *Ber. chem. Ges.*, **20**, 181 (1887).
3. Rosin. *Zeit. phys. Chem.*, 38, 555 (1903).
4. Neuberg. *Ber. chem. Ges.*, **35**, 952 (1902).
5. Ofner. *Zeit. phys. Chem.*, **45**, 359 (1905).
6. Neuberg et Strauss. *Zeit. phys. Chem.*, **36**, 232 (1902).

160° et qui, dissoute dans la proportion de 0 gr. 20 dans un mélange de 4 cm³ de pyridine et de 6 cm³ d'alcool absolu, et examinée au tube de 1 déc. donne une déviation dextrogyre de 1°40'.

Si l'on veut doser le lévulose à l'aide du polarimètre, il ne faudra pas oublier que son pouvoir rotatoire diminue à mesure que la température s'élève et varie avec la concentration des solutions. Il suffira d'appliquer la formule donnée par JUNGFLEISH et GRIMBERT[1].

$$\alpha_D = -[101°38 - 0{,}56\ t + 0{,}108\ (p - 10)]$$

Alors que le lévulose est très répandu dans le règne végétal, on ne le rencontre guère dans le règne animal. La cause doit en être dans sa grande oxydabilité qui lui permet d'être intégralement brûlé dans l'intimité des tissus.

X. — PENTOSES.

SALKOWSKI[2] a le premier signalé la présence des pentoses dans l'urine; KÜLZ et VOGEL[3] les ont ensuite découverts dans l'urine diabétique et dans l'urine des chiens privés de pancréas. Ils ont en outre signalé toute une série de cas de pentosurie dans l'urine humaine. D'après NEUBERG[4] la moitié des pentoses se trouve dans l'urine à l'état libre, et l'autre moitié en combinaison avec l'urée. OSWALD SCHWARZ[5] les a considérés comme la substance génératrice de la réaction de CAMMIDGE (voir page 27).

SALKOWSKI a retiré un pentose du pancréas et l'a identifié avec le pentose extrait par lui de l'urine. HAMMARSTEN[6] a obtenu ces sucres dans l'hydrolyse des nucléo-protéides du pancréas. Enfin, H. GRUND[7] les a encore caractérisés dans différents organes animaux après avoir séparé l'acide glycuronique à l'aide d'alcool et d'éther. La richesse en pentoses des organes varie dans le même sens que leur richesse en éléments nucléés et les organes peuvent ainsi être classés par ordre décroissant : pancréas, foie, thymus,

1. JUNGFLEISH et GRIMBERT. *C. R. Ac. des Sciences*, **107**, 390 (1888) et **108**, 144 (1889).
2. SALKOWSKI. *Zeit. phys. Chem.*, **27**, 507 (1899), et *Centr. medic. Wissens.* (1892), 337 et 593.
3. KÜLZ et VOGEL. *Zeit. f. Biol.*, **32**, 185 (1895).
4. NEUBERG. *Ergebnisse der Physiol.*, **3**, 1, 408 (1904).
5. OSWALD SCHWARZ. *Wiener klin. Wochenschrift* (1909), 4 mars.
6. HAMMARSTEN. *Zeit. phys. Chem.*, **19**, 19 (1894).
7. H. GRUND. *Zeit. phys. Chem.*, **35**, 111 (1902).

glande thyroïde, rate, rein, glande sous-maxillaire, cerveau, muscles. La réserve en pentoses de l'organisme humain s'élèverait à 10 gr. 50 environ.

Recherche. — Les pentoses ne sont pas fermentescibles. Ils donnent avec le phénylhydrazine une osazone qui a permis à Salkowski de les caractériser dans l'urine et dont le point de fusion de 159°-160° peut être abaissé d'environ 10° après purification.

Chauffés avec de l'acide chlorhydrique, les pentoses fournissent du furfurol facile à caractériser. Leur solution chlorhydrique additionnée d'orcine ou de phloroglucine permet d'obtenir à chaud des colorations qui, ainsi que la réaction précédente, leur sont communes avec l'acide glycuronique. Nous les étudierons ultérieurement. (Voir page 54.)

Blumenthal [1], qui s'est aussi occupé de la caractérisation des pentoses dans l'urine, les sépare à l'état de combinaison barytique, précipitable par l'alcool. Le précipité recueilli est lavé, mis en suspension dans l'eau et traité par un courant d'acide carbonique qui précipite le baryum à l'état de carbonate insoluble. La solution filtrée et évaporée abandonne les pentoses cristallisés.

Les pentoses extraits de l'urine n'ont pu, pendant longtemps, être identifiés avec les pentoses déjà connus, arabinose et xylose. Néanmoins, Salkowski [2], dans ces dernières années, a obtenu de certaines urines de l'arabinose racémique, et Luzzato [3] aurait isolé de l'arabinose active.

Le dosage des pentoses s'effectue après distillation avec l'acide chlorhydrique en précipitant le furfurol formé, soit à l'état de furfurol hydrazone, soit à l'état de furfurol phloroglucide.

Neuberg et Wohlgemuth [4] ont proposé de doser les pentoses directement à l'état de diphénylhydrazone.

Les pentoses de l'organisme proviennent, d'après Salkowski, des aliments végétaux. D'autres auteurs les attribuent à l'hydrolyse des nucléoalbuminoïdes.

Otto Ruff [5] pense qu'ils peuvent dériver des produits de l'oxydation régulière du glucose, tels que l'acide glycuronique.

---

1. Blumenthal. *Berliner klin. Wochenschrift* (1897), 245, et *Zeit. f. klin. Medic.*, **34**, 166 (1899).
2. Salkowski. *Centralblatt f. klin. Wissenchaft* (1892), n°s 19 et 35.
3. Luzzato. *Beiträge z. chem. Phys. und Pathol.*, **6**, 87 (1905).
4. Neuberg et Wohlgemuth. *Zeit. phys. Chem.*, **35**, 31 (1902).
5. Otto Ruff. *Ber. chem. Ges.*, **31**, 1523 (1898), et **32**, 550 (1899).

XI. — Acide glycuronique

L'acide glycuronique, produit d'oxydation du glucose, a été souvent caractérisé dans quelques liquides physiologiques. Plusieurs des conjugués qu'il est susceptible de former avec les alcools et les phénols ont pu être extraits de l'urine après l'absorption de médicaments divers.

Je passe sous silence les procédés de caractérisation de cet acide, sur lesquels j'aurai l'occasion de revenir au cours de ce travail. Je mentionne seulement les combinaisons qu'il donne avec la phénylhydrazine, combinaisons qui feront l'objet d'un chapitre spécial.

XII. — Urée.

Jaffé [1] remarqua le premier que des urines exemptes de sucre étaient susceptibles de fournir des précipités avec la phénylhydrazine. Le composé ainsi formé, extrait de l'urine des chiens nourris avec de la viande, fut identifié avec la phénylsemicarbazide déjà obtenue par Fisher dans l'action des sels de phénylhydrazine sur le cyanate de potasse et dont la formule est :

$$C^6H^5 - AzH - AzH - CO - AzH^2.$$

La phénylsemicarbazide est encore engendrée dans l'action de la phénylhydrazine sur l'urée en milieu acétique, la chaleur et l'acide acétique transformant progressivement l'urée en cyanate d'ammoniaque.

Hugo Milrath [2] a déterminé dans quelles conditions cette transformation était possible et est arrivé aux conclusions suivantes, soit en opérant sur de l'urine dans laquelle il avait préalablement dosé l'urée, soit avec des solutions d'urée pure.

La phénylhydrazine ne réagit pas sur l'urée dans des solutions chauffées deux heures au bain-marie ; si on prolonge le temps de chauffe dans les mêmes conditions pendant quatre à cinq heures, on a formation d'un précipité.

A feu nu et à l'ébullition, l'action est beaucoup plus rapide ; le précipité apparaît au bout de deux heures et la réaction est ter-

1. Jaffé. *Zeit. phys. Chem.*, **22**, 532 (1896).
2. Hugo Milrath. *Zeit. phys. Chem.*, **56**, 126 (1908).

minée après dix heures. La proportion d'urée transformée est d'environ 80 °/₀. Les cristaux recueillis, et purifiés s'ils ont été extraits de l'urine où ils sont souillés d'une matière brune et visqueuse, fondent à 169°-170°.

La proportion d'acide acétique employé dans ces opérations ne doit pas être trop forte. En effet, l'acide acétique relativement concentré réagit sur la phénylhydrazine pour donner des cristaux de monoacétylphénylhydrazine,

$$C^6H^5 — AzH — AzH — CO — CH^3$$

ou un mélange de ce corps avec la phénylsemicarbazide si on opère en présence d'urée. Le dérivé acétylé ne se forme d'ailleurs que dans les solutions dont le titre en acide acétique dépasse notablement 5 °/₀.

CHAPITRE III

Réaction de Cammidge dans l'urine.

Dans ces derniers temps, Nicloux[1] a fait de la glycérine un élément normal du sérum sanguin. Quelques années avant lui, Cammidge[2] basa sur la présence anormale de cet élément dans l'urine un procédé de diagnostic des affections du pancréas. La réaction qu'il décrivit, depuis longtemps déjà annoncée par Mayo Robson[3] et grâce à son appui eut un énorme retentissement dans le monde médical. Quelques-uns crurent avoir trouvé là un élément infaillible de caractérisation des maladies pancréatiques. Mais bientôt des discussions violentes s'élevèrent, tant sur la nature du composé qui donne naissance à la réaction de Cammidge que sur la réaction elle-même, et les mémoires les plus contradictoires inondèrent la littérature médicale.

A l'heure actuelle, la lutte dure encore et malgré les attaques dont elle a été l'objet, l'épreuve de Cammidge fait force de loi auprès de certains cliniciens. Devant l'importance prise par cette réaction, je crois utile de décrire quelque peu en détail les procédés successifs préconisés par l'auteur, et de rappeler brièvement les discussions qui en ont été les conséquences.

Première réaction de Cammidge. — Origine des recherches.

Au cours de la digestion, les corps gras sont en partie saponifiés avec mise en liberté d'acides gras et de glycérine. Or, les injections intraveineuses de glycérine produisent les mêmes symptômes que les pancréatites. Cammidge a donc pensé que dans certains états de l'organisme, une grande proportion de la glycérine provenant du dédoublement des corps gras pouvait échapper

1. Nicloux. *Journal de physiol. et de pathol. gén.*, **5**, 803 et 827.
2. P. J. Cammidge. *The Lancet* (1904), 19 mars, **1**, 782.
3. Mayo Robson. *Journal médical de Philadelphie* (1901), 1er juin.

à l'oxydation et produire les mêmes désordres. De plus, les acides gras mis en liberté seraient saturés par les sels de chaux du sang dont ils entraîneraient la décalcification et par là même l'incoagulabilité.

La glycérine se trouvant en plus grande quantité dans l'organisme devait y être facilement caractérisée.

Renonçant à sa recherche dans le sang qu'il juge trop délicate, Cammidge propose de la déceler dans l'urine en l'oxydant préalablement et en caractérisant le glycérose formé par son osazone.

Après avoir étudié l'action des divers acides dans cette oxydation et examiné la façon dont se comporte l'urine de personnes normales et atteintes d'affections diverses, Cammidge s'arrête à la technique suivante, si compliquée qu'il me semble nécessaire de la reproduire textuellement :

Réaction A. — L'urine est filtrée, et 10 cm^3 sont introduits avec 1 cm d'acide chlorhydrique concentré dans un récipient dont le col est surmonté d'un entonnoir destiné à servir de réfrigérant. L'urine est maintenue à l'ébullition pendant dix minutes sur un bain de sable. On ajoute alors un mélange de 5 cm^3 d'urine filtrée et de 5 cm^3 d'eau distillée et on refroidit sous un courant d'eau. L'acide est neutralisé par addition de 4 gr. de carbonate de plomb et après quelques minutes de contact, l'urine est filtrée sur un filtre mouillé qu'on lave ensuite ainsi que le flacon avec 5 cm^3 d'eau distillée. Le filtrat est additionné de 2 gr. d'acétate de soude et de 0 gr. 75 de chlorhydrate de phénylhydrazine et le mélange bouilli trois à quatre minutes sur un bain de sable. Le liquide chaud est alors versé dans un tube à essai et abandonné au refroidissement.

Après un temps variant, avec la gravité des cas, de une heure à vingt-quatre heures, on constate au fond du tube un dépôt floconneux, jaune, plus ou moins abondant, qui, au microscope, est constitué par des cristaux jaune d'or, en gerbes ou en rosettes. La présence du sucre pouvant fausser les résultats, il est nécessaire de s'assurer que l'urine ne donne pas directement de réaction avec la phényldrazine ou la liqueur de Fehling. Le sucre, s'il s'en trouve, doit être éliminé par fermentation en chassant ensuite l'alcool par ébullition. On doit également se débarrasser de l'albumine, soit par le sulfate d'ammoniaque, soit par l'ébullition en milieu acétique.

Quoique très utiles pour le diagnostic, les résultats positifs ne doivent pas être regardés comme absolus. Ils peuvent, en effet, être obtenus avec d'autres affections, comme la pneumonie, les adénites, le cancer, etc. Aussi, a-t-on cherché un moyen qui permît d'obtenir seulement la formation des cristaux dans les

cas d'affections malignes du pancréas. Cette seconde réaction est basée sur le traitement préalable de l'urine par le bi-chlorure de mercure.

Réaction B. — 20 cm^3 d'urine filtrée sont mélangés avec la moitié de leur volume d'une solution saturée de bi-chlorure de mercure. Après quelques minutes de contact, on filtre avec soin, on ajoute 1 cm^3 d'acide chlorhydrique, on fait bouillir dix minutes sur un bain de sable, et on dilue avec 5 cm^3 du mélange filtré de l'urine et du bichlorure de mercure et 10 cm^3 d'eau distillée. Après refroidissement, on neutralise avec 4 gr. de carbonate de plomb et on continue comme pour la réaction A.

La forme des cristaux peut éclairer le diagnostic. Avec les infections malignes, ils sont plus courts et plus larges que dans les simples inflammations chroniques.

Un caractère d'une plus grande valeur est basé sur la rapidité de leur dissolution dans l'acide sulfurique dilué, qui dépend non de la différence des cristaux, ainsi qu'on l'avait pensé, mais de l'intensité des échanges inflammatoires de la glande. Les cristaux traités sous la lamelle par de l'acide sulfurique au quart brunissent au contact de l'acide et se dissolvent. Dans les pancréatites aiguës, le temps écoulé entre la teinte brune et la solution complète varie de quelques secondes à trente ou quarante-cinq secondes. Dans les pancréatites chroniques, l'intervalle est d'une demi à une minute et demie et rarement deux minutes. Dans les maladies malignes du pancréas, les cristaux ne disparaissent qu'après trois à cinq minutes.

En résumé :

1° Réactions A et B négatives : pancréas non malade.

2° Réaction A positive, Réaction B négative :

Inflammation grave du pancréas, intervention chirurgicale indiquée.

a) Inflammation aigue, dissolution des cristaux dans l'acide sulfurique en une demi-minute environ.

b) Inflammation chronique, dissolution en une à deux minutes.

3° Réactions A et B positives :

a) Maladie maligne ; dissolution des cristaux demandant de trois à cinq minutes, opération inutile.

b) Pancréatite ancienne, dissolution en une à deux minutes.

c) Maladies n'intéressant pas le pancréas, dissolution en une minute.

A peine parue, la réaction de Cammidge souleva de violentes critiques.

Ham et Cleland[1] trouvent plutôt douteuse la base scientifique de la réaction et obtiennent dans tous les cas examinés et même avec de l'eau distillée les cristaux jaunes caractéristiques qu'ils affirment être un composé plombique.

Cammidge[2] s'en prend aussitôt à la technique des auteurs, et les accuse d'avoir confondu des cristaux de chlorure de plomb plus solubles à chaud qu'à froid avec des cristaux d'osazone.

La polémique continue d'ailleurs. Ham et Cleland[3] protestent que leurs cristaux ne sont pas du chlorure de plomb, mais bien un composé de plomb et de phénylhydrazine, impossible à distinguer de l'osazone de la réaction pancréatique.

Cammidge[4], dans un mémoire nouveau, pratique l'hydrolyse de l'urine avec de l'acide sulfurique qu'il neutralise par le carbonate de baryte; la réaction est semblable, et le plomb ne peut plus être mis en cause. D'ailleurs, les cristaux obtenus ne contiennent pas de plomb.

Il décrit à nouveau ses cristaux qu'il rapproche par la forme de la maltosazone, et qui ne sont pas identiques à la glucosazone ainsi qu'on l'a laissé entendre.

Entre temps, Grüner[5] annonce avoir obtenu des réactions positives dans les affections sans aucun rapport avec le pancréas, et Bushnell[6] trouve également en défaut l'épreuve de Cammidge.

Quelques années plus tard, Wilcox[7] apporte une étude sérieuse et des expériences précises.

Il opère sur plusieurs urines normales, et fait réagir la phénylhydrazine sur l'urine non hydrolysée. Il ne se forme pas d'osazone, mais seulement des dépôts brunâtres, amorphes ou renfermant quelques petites masses sphériques avec spicules, de cristallisation mal définie.

En opérant sur de l'urine préalablement hydrolysée par l'acide chlorhydrique et neutralisée par le carbonate de plomb ou la

---

1. Ham et Cleland. *The Lancet* (1904), 14 mai.
2. Cammidge. *The Lancet* (1904), 16 mai.
3. Ham et Cleland. *The Lancet* (1904), 11 juin.
4. Cammidge. *The Lancet* (1904), 18 juin.
5. Grüner. *The Lancet* (1904) 21 mai.
6. Bushnell. *The Lancet* (1904), 11 juin.
7. Wilcox. *The Lancet* (1904), 23 juillet.

soude, il obtient invariablement des cristaux d'osazone en étoiles ou en faisceaux.

Une série d'expériences instituées par Wilcox lui permettent d'arriver aux conclusions suivantes: La substance qui donne naissance à la réaction est insoluble dans l'alcool absolu. L'urée, la créatinine, l'acide urique, l'acide hippurique, les pigments de l'urine ne peuvent dans ces conditions fournir d'osazone. La substance génératrice n'est pas la glycérine, avec laquelle on ne peut obtenir aucune réaction en suivant la technique indiquée. L'urine normale contient donc invariablement une substance, peut-être un polysaccharide ou un glycoprotéide, sans action sur la phénylhydrazine et qui, par hydrolyse, donne naissance à un sucre capable de former une osazone.

La production de cristaux jaunes caractéristiques ne peut donc, dans aucun cas, être utilisée comme réaction spécifique d'un cas pathologique.

Cammidge[1] accuse aussitôt Wilcox d'avoir modifié sa manière d'opérer, et l'année suivante, dans un mémoire sur la réaction de la phénylhydrazine avec d'autres substances que le glucose dans l'urine[2], précise à nouveau sa méthode.

Admettant que différents sucres, l'acide glycuronique et d'autres substances mal connues, sont susceptibles de fournir des composés avec la phénylhydrazine, l'auteur cherche à différencier les osazones par leur forme de cristallisation, et avec une statistique de 479 échantillons apporte les photographies des cristaux qu'il considère comme typiques.

La lutte déchaînée par la nouvelle réaction a d'ailleurs gagné l'étranger. Signalée par Schroeder[3] aux Etats-Unis et par Cowie, Roche et Cooke[4], elle est vivement combattue par John Hancock[5] et par Musser, Dutton et Fife[6].

En 1906, Gilbert Barling[7] et Lowatt Evans renouvellent les expériences de Wilcox avec la glycérine, attaquent les conclusions

---

1. Cammidge. *The Lancet* (1904), 30 juillet.
2. Cammidge. *The Lancet* (1905), **2**, 14.
3. Schroeder. *Americ. Medic.*, Philadelphie (1904), **8**, 406.
4. Cowie, Roche and Cooke. *Physician Surgeon* (1905), **27**, 156.
5. John Hancock. *Journal of the American Medical Association*, Chicago (1906), janvier, **1**, 275.
6. Musser, Dutton and Fife. *Transactions of the Association of American Physicians*, Philadelphie, **21**, 359.
7. Gilbert Barling. *Britisch Medical Journal* (1906), 24 février.

basées sur la plus ou moins grande solubilité des cristaux dans l'acide sulfurique, affirment la réaction B fort peu utile, et n'accordent quelque valeur à l'épreuve qu'à la condition d'opérer avec une urine parfaitement fraîche et exempte de sucre.

Chaque attaque amène une réponse de CAMMIDGE[1] qui dit ne pas avoir voulu caractériser la glycérine à l'aide de sa réaction et plaide en faveur de la réaction B qui lui permet de mesurer l'intensité de la maladie.

DEUXIÈME RÉACTION DE CAMMIDGE.

Néanmoins, quelques jours plus tard, CAMMIDGE[2] décrit une nouvelle méthode basée sur un nouveau principe.

La glycérine n'est plus en cause ; bien plus, l'auteur se défend d'avoir jamais eu en vue la caractérisation de cette substance dans les maladies du pancréas. L'osazone de la réaction A est due, pense-t-il, à la combinaison de la phénylhydrazine, de l'acide glycuronique et d'un sucre inconnu, celle de la réaction B à la combinaison de la phénylhydrazine et de l'acide glycuronique seulement. En précipitant préalablement l'acide glycuronique par l'acétate de plomb, la réaction sera très simplifiée.

L'auteur[3] insiste sur la nécessité d'opérer sur l'urine des vingt-quatre heures, fraîche, non fermentée, exempte de sucre, d'albumine.

20 cm³ sont additionnés de 1 cm³ d'acide chlorhydrique de densité 1,16. On fait bouillir dix minutes sur un bain de sable. On refroidit le mélange et on le ramène à 20 cm³ avec de l'eau distillée. On neutralise avec 4 gr. de carbonate de plomb, on filtre et on additionne le filtrat de 4 gr. d'acétate tribasique de plomb pulvérisé. On filtre jusqu'à obtention d'un liquide absolument clair, précaution indispensable. On élimine le plomb par addition de 2 gr. de sulfate de soude, on agite, on fait bouillir et on filtre après refroidissement complet.

A 10 cm³ du filtrat, on ajoute 8 cm³ d'eau distillée, 0 gr. 80 de chlorhydrate de phénylhydrazine, 2 gr. d'acétate de soude et 1 cm³ d'acide acétique à 50 °/₀. On fait bouillir pendant dix minutes au bain de sable. On filtre à chaud dans un tube à essai. Les cristaux caractéristiques se déposent, soit immédiatement, soit après quelques heures.

Ils se présentent sous forme de rosaces et d'aiguilles de couleur jaune, et

1. CAMMIDGE. *British Medical Journal* (1906), 26 février.
2. CAMMIDGE. *Trans. Royal Medic. and Chir. Soc.* (1906), 13 mars.
3. CAMMIDGE. *Edinburgh Medical Journal* (1907), février, **21**, 129.

sont solubles dans l'acide sulfurique à 33 °/₀. Le précipité doit toujours être examiné au microscope.

A la suite de cette nouvelle communication la lutte recommence. Tandis que quelques-uns, comme TAYLOR[1], trouvent la réaction susceptible de rendre des services dans les maladies du pancréas, d'autres, comme HALDANE[2], s'efforcent de lui enlever toute valeur et de démontrer que les cristaux caractéristiques apparaissent aussi bien dans les urines normales que dans les urines des personnes atteintes de maladies variées. Comme réponse, CAMMIDGE[3] apporte une nouvelle statistique et conclut que l'hydrate de carbone qui produit la réaction a les caractères d'un pentose.

En Allemagne, EICHLER[4] affirme qu'elle ne se produit pas dans les urines d'animaux sains; AGABEKOFF[5], en Russie, dit en avoir eu quelques résultats, mais ELOESSER[6] la critique, ainsi qu'un grand nombre d'autres praticiens.

En 1908, CHALMERS WATSON[7], avec statistique à l'appui, conclut en faveur de la réaction, et LÉPINE[1] dit que bien que nous ne soyons pas en état d'en donner une théorie satisfaisante, « sa valeur clinique ne semble pas nulle dans les pancréatites aiguës ».

Au cours de l'année qui vient de s'écouler, de nombreux mémoires traitent encore de la réaction de CAMMIDGE, sans que d'ailleurs l'accord se fasse entre partisans et détracteurs. KRIENITZ[9] lui accorde une grande valeur.

HAGEN[10], en Allemagne, dit de la réaction de CAMMIDGE, qu'elle est une méthode très intéressante de diagnostic des affections du pancréas, bien que de nouvelles observations soient nécessaires. MAAS[11], au contraire, même en suivant scrupuleusement la technique indiquée, n'a pu conclure de façon favorable. Il en est de même de SEIDEL[12], qui l'a vue en défaut dans des cas avérés de

1. TAYLOR. *The Lancet* (1906), 30 juin, 1, 1818.
2. HALDANE. *Edinburgh Medical Journal* (1906), novembre, 20, 418.
3. CAMMIDGE. *Edinburgh Medical Journal* (1907), février, 21, 129.
4. EICHLER. *Berliner klin. W.* (1907), 44, 769.
5. AGABEKOFF. *Russk. Vracht*, Saint-Pétersbourg (1907), 6, 1175 et 1211.
6. ELOESSER. *Milteil. aus dem Grenzgebieten der Med. und Chirurg.* (1907), 18, 2.
7. CHALMERS WATSON. *The Lancel* (1908), 28 mars, 1, 967, et 21 novembre, 2, 1519.
8. LÉPINE. *Semaine méd.* (1908), avril, 14, 157.
9. KRIENITZ. *Archiv für Verdauungs Krankh.* (1909), 15 février, 54.
10. HAGEN. *Beiträge zur klin. Chirurgie* (1909), février, 61, 750.
11. MAAS. *Mediz. Ktinik* (1909), 31 janvier, 5, 177.
12. SEIDEL. *Congrès de la Société allemande de Chirurgie* (1909), avril.

pancréatite, et par contre positive dans des affections ne touchant pas le pancréas. Enfin, ROTH[1] affirme son inconstance et son extrême irrégularité.

En France, H. LABBÉ[2], dans la *Presse médicale*, étudie la réaction et dit: « La concordance de la réaction directement exécutée avec les atteintes pancréatiques paraît assez réelle, mais elle est loin d'être encore fondée sur un assez grand nombre de cas. » Enfin, dans une thèse très documentée, le Dr CARTIER[3], que je suis heureux de remercier des nombreuses notes bibliographiques qu'il a eu l'obligeance de me communiquer, conclut que la réaction de CAMMIDGE « ne saurait être un signe pathognomonique des affections du pancréas ».

« La production des cristaux est inconstante, et leur forme variable en des limites qu'il est également difficile de préciser. La valeur clinique de la réaction est minime; sa technique, longue, compliquée et délicate, fournit très souvent des résultats positifs avec des affections étrangères aux maladies du pancréas. »

Après cinq années de luttes et de discussions, la question en est encore à son point de départ. Les opinions les plus diverses ont pris jour sans qu'une seule soit parvenue à fixer définitivement une question aussi importante, tant dans le domaine de la chimie biologique que dans celui de la pathologie.

---

1. ROTH. *Zeitschrift für klinische Medizin*. (1909), 67.
2. H. LABBÉ. *Presse médicale* (1909), 6 février, nº 11, 90.
3. L. CARTIER. La réaction de CAMMIDGE. *Thèse* de la Faculté de médecine de Paris, 1909.

DEUXIÈME PARTIE

L'ACIDE GLYCURONIQUE DANS L'ORGANISME

CHAPITRE PREMIER

Action de la phénylhydrazine sur l'urine.

La diversité des opinions émises sur la réaction de Cammidge m'a engagé à aborder une fois de plus ce sujet et à chercher à déterminer la nature du composé qui dans l'urine donne naissance à une substance capable de former avec la phénylhydrazine une osazone cristallisée. Devant les résultats si différents annoncés par tous ceux qui se sont occupés de cette question, j'ai cru utile de reprendre par le début toutes les expériences et de diriger ensuite mes recherches d'après les résultats obtenus.

Ce sont ces recherches et les conclusions qui en découlent que je me propose d'exposer dans ce travail.

I. — Action de la phénylhydrazine sur l'urine non hydrolysée.

1° **Directement.** — Avant d'aborder la question de l'action de la phénylhydrazine sur les urines préalablement soumises à l'influence des acides, j'ai examiné la façon dont se comportait ce réactif avec les urines non hydrolysées.

De nombreux échantillons d'urine normale, de réaction acide, non fermentée et parfaitement limpide, ont été traités d'après la technique suivante :

20 cm^3 d'urine sont additionnés dans un tube à essai de 1 cm^3 d'une solution d'acétate de soude à 25 °/₀, 1 cm^3 d'acide acétique cristallisable et 1 cm^3 de phénylhydrazine et portés au bain-marie bouillant pendant trois quarts d'heure à une heure.

Le tube à essai est abandonné au refroidissement lent dans

le bain-marie lui-même et examiné après douze à vingt-quatre heures.

Dans tous les cas, le liquide s'est fortement troublé, et s'est déposé au fond du tube un précipité plus ou moins abondant qui, examiné au microscope à un assez fort grossissement, se montre constitué par de nombreuses gouttelettes de phénylhydrazine et des impuretés diverses. Parfois l'observation la plus attentive ne permet de déceler aucun autre élément; dans la plupart des cas, au contraire, on aperçoit en nombre plus ou moins considérable de très petits cristaux souvent mal formés, affectant des formes de rosettes.

Ces formes à peine cristallisées ont été signalées par Hirschl [1], et Wilcox [2], plus récemment, dit avoir obtenu avec quelques urines normales « une certaine quantité de ces cristaux jaunes mal définis, sorte de petites masses sphériques avec spicules ».

Les précipités qui se forment ainsi dans les urines après action de la phénylhydrazine sont fort peu abondants. J'ai néanmoins essayé d'en recueillir une certaine quantité. Il est possible en effet d'obtenir avec 100 ou 200 cm^3 d'urine une proportion appréciable de produit; mais sa purification, soit par cristallisations répétées dans l'eau bouillante, soit par lavages à la benzine après dessiccation dans le vide, n'a fourni qu'une masse brunâtre, impure, présentant un point de fusion qu'il est impossible de déterminer avec rigueur.

Il semblait donc *a priori* difficile d'obtenir dans l'action de la phénylhydrazine sur l'urine, des produits suffisamment purs pour en permettre un examen sérieux.

Dans le but de m'en rendre compte et de ne pas prolonger des recherches infructueuses, j'ai songé à additionner l'urine normale de quantités connues, mais très faibles, de glucose et de chercher à les caractériser par la formation de leur osazone.

J'ai fait agir l'acétate de phénylhydrazine directement sur de l'urine additionnée de glucose dans la proportion de 0 gr. 25 par litre. Ces essais répétés sur sept urines différentes ne m'ont en aucun cas fourni de glucosazone cristallisée en une forme quelconque, mais seulement des dépôts brunâtres laissant apercevoir au microscope à un fort grossissement des petites masses affectant

---

1. Hirschl. *Zeit. phys. Chem.*, **14**, 377 (1890).
2. Wilcox. *The Lancet* (1904), juillet 23, 211.

des formes plus ou moins cristallines, tout à fait analogues à celles obtenues dans l'action directe de la phénylhydrazine sur l'urine. Tous ces essais ayant été effectués comparativement avec des urines non additionnées de glucose, il était impossible de distinguer, même à l'examen microscopique, les solutions contenant ou ne contenant pas de sucre, alors que dans des solutions pures de la même dilution, le glucose est très nettement caractérisé.

Il fallait donc renoncer à faire réagir la phénylhydrazine sur un milieu aussi complexe que l'urine et chercher par la défécation à éliminer les éléments susceptibles de troubler les réactions.

2° **Après défécation.** — J'ai donc étudié successivement les plus courants des déféquants employés.

1° *Acétate neutre de plomb.* — La solution de Courtonne, bien connue dans les laboratoires, se prépare de la façon suivante :

Acétate neutre de plomb.	300	gr.
Eau distillée, Q. S. pour	1.000	cm^3.
Acide acétique, Q. S. pour obtenir une légère réaction acide.		

L'urine, additionnée de 1/10 de ce réactif et filtrée, est traitée par la phénylhydrazine dans les proportions déjà indiquées précédemment. Par refroidissement quelques urines n'abandonnent qu'un dépôt insignifiant constitué par des gouttelettes de phénylhydrazine et des impuretés diverses ; mais dans la plupart des échantillons il se forme en quantité plus ou moins abondante, jamais considérable, des cristaux jaune d'or présentant au microscope une apparence cristalline très nette.

Ces osazones obtenues avec 50 ou 100 cm^3 d'urine déféquée, sont en quantité suffisante pour être facilement examinées.

Recueillies sur un filtre, lavées à l'eau et séchées dans le vide, elles sont ensuite traitées par la benzine, qui dissout la phénylhydrazine retenue par les cristaux sans toucher à l'osazone elle-même. Les lavages à la benzine sont continués sur le filtre jusqu'à ce que ce dissolvant passe sensiblement incolore ; enfin l'osazone est séchée à basse température. Elle se présente sous forme d'une masse jaune d'or quant elle est très pure, légèrement brunâtre quand la purification n'a pas été complète.

Son point de fusion, déterminé au Bloc Maquenne, est de 135°-137°. Par recristallisation dans l'eau bouillante ou même directement lorsque l'osazone est très pure, il est de 130°-132°.

2° *Sous-acétate de plomb.* — En substituant pour la défécation le sous-acétate de plomb au réactif de COURTONNE, on arrive aux mêmes résultats ; la quantité d'osazone formée a pu, dans certains cas, paraître un peu moins abondante, mais dans beaucoup d'autres elle était sensiblement la même.

3° *Nitrate mercurique.* — Le réactif préconisé par PATEIN et DUFAU[1] se prépare de la façon suivante : On met dans une capsule en porcelaine 160 cm^3 d'acide azotique de D. = 1.37 et on ajoute, en remuant vivement pour éviter la formation des grumeaux, 220 gr. d'oxyde de mercure. Après quelques minutes, on ajoute 160 cm^3 d'eau distillée et on porte à l'ébullition. La dissolution effectuée, on laisse refroidir et on verse peu à peu 40 cm^3 de lessive de soude au quart. On agite, on complète le volume à 1.000 cm^3 avec de l'eau distillée et on filtre.

J'ai utilisé ce réactif comme l'ont indiqué ses auteurs pour la recherche du glucose dans l'urine. 50 cm^3 d'urine sont additionnés de 25 cm^3 de réactif. Le mélange est neutralisé à peu près exactement avec de la soude et amené avec de l'eau distillée à 100 cm^3. On filtre ; la solution obtenue est incolore et d'une limpidité parfaite, mais contient du mercure dont il faut la débarrasser. J'ai employé dans ce but soit la poudre de zinc, soit l'hydrogène sulfuré, soit l'addition d'une goutte de phénylhydrazine qui précipite instantanément tout le mercure. Le mode d'élimination n'a d'ailleurs aucune importance sur les résultats. L'urine ainsi déféquée est traitée d'après la technique déjà décrite, et fournit dans les mêmes conditions une osazone parfaitement cristallisée présentant les mêmes caractères, mais en général plus abondante que dans les opérations précédentes bien que la liqueur ait été dédoublée.

A quoi attribuer cette formation plus considérable d'osazone ? J'ai pensé que les conditions dans lesquelles était effectuée la défécation pouvaient intervenir dans le dédoublement d'un composé donnant naissance à un corps susceptible de fournir avec la phénylhydrazine une combinaison cristallisée.

Des essais comparatifs ont été faits en amenant la liqueur avec la soude, soit à une légère alcalinité, soit à neutralité, soit en lui

---

1. PATEIN et DUFAU. *Journ. Pharm. et Chim.* (6), 10, 433 (1899), et *Répert. pharm.* (1902), 51.

laissant une faible réaction acide; la proportion d'osazone formée est restée sensiblement la même.

Le temps écoulé entre la défécation proprement dite et la neutralisation pouvant avoir une plus grande importance, j'ai traité plusieurs échantillons d'urine par le réactif mercurique, l'un d'eux étant immédiatement neutralisé, les autres étant conservés en milieu acide pendant un temps plus ou moins long. Même dans les cas où la neutralisation suivait immédiatement la défécation, la quantité d'osazone formée était plus considérable que dans l'emploi des sels de plomb, mais cependant semblait croître avec les temps de contact en milieu acide.

Des faits analogues peuvent d'ailleurs être observés lorsqu'on traite de la même façon une solution de saccharose.

Dans le but d'en faire la preuve, j'ai préparé une solution de saccharose au 1 °/₀₀ et l'ai divisée en trois parties.

La première, mise en contact au bain-marie pendant trois quarts d'heure avec de la phénylhydrazine, de l'acide acétique et une solution d'acétate de soude, a fourni une quantité insignifiante d'osazone mal cristallisée, provenant d'un léger dédoublement du sucre par l'acide acétique pendant le chauffage au bain-marie.

Le saccharose, sucre très facilement dédoublable, devrait, semble-t-il, subir l'hydrolyse pendant le chauffage. Il n'en est rien cependant; Jungfleish et Grimbert[1] ont, en effet, démontré que la présence des acétates alcalins entravait l'interversion par l'acide acétique, même quand ce dernier est employé en grand excès.

Un deuxième échantillon, déféqué par le réactif de Patein et Dufau et neutralisé aussitôt, a laissé cristalliser une faible quantité d'osazone, néanmoins plus abondante que dans le cas précédent et affectant la forme capillaire obtenue avec les solutions très diluées de glucose.

La troisième portion, traitée de même, mais abandonnée deux jours en milieu acide, puis neutralisée, a donné une osazone, sinon abondante, tout au moins beaucoup plus considérable que dans le second cas. Il y a donc eu interversion partielle.

Les mêmes faits semblent se reproduire dans l'action du réactif de Patein sur l'urine.

Si le nitrate mercurique a l'inconvénient de produire une hydrolyse partielle, il a l'avantage de donner des liqueurs dans

1. Jungfleish et Grimbert. *C. R. Académie des Sciences*, **109**, 867 (1889).

lesquelles les osazones cristallisent très facilement. On peut donner la preuve en additionnant l'urine, comme je l'ai déjà fait précédemment, de 0 gr. 25 de glucose par litre. Après action de la phénylhydrazine on aperçoit au microscope deux osazones très nettement cristallisées, différant non seulement de forme, mais de couleur, l'osazone étudiée étant jaune d'or, le glucosazone paraissant jaune verdâtre.

3° **Origine de l'osazone.** — L'osazone qui se forme ainsi d'une façon constante dans l'urine, peut provenir d'un corps existant à l'état libre dans ce liquide ou apparaissant seulement pendant le chauffage en milieu acétique, par dédoublement d'un composé facilement hydrolysable.

La concentration plus ou moins grande d'acide acétique pouvant, semblait-il, avoir une influence sur les résultats, j'ai traité plusieurs échantillons de 20 cm³ d'urine par 1 cm³ d'une solution d'acétate de soude à 25 °/₀, 1 cm³ de phénylhydrazine et des proportions d'acide acétique croissant de 1/2 à 2 cm³. J'ai obtenu dans tous les cas des cristallisations très nettes et aussi abondantes.

La concentration de l'acide n'a donc aucune influence soit par hydrolyse, soit par solubilisation de l'osazone.

Le temps pendant lequel les liquides sont tenus au bain-marie, temps que j'ai fait varier de une demi-heure à une heure et demie, paraît aussi ne pas influencer les résultats.

Dans le but de diminuer les chances d'hydrolyse en abaissant la température, j'ai fait quelques essais en opérant à 80°, mais dans ces conditions les osazones, quelles qu'elles soient, se forment mal, et j'ai dû abandonner cette façon de procéder.

La formation des osazones avec l'acétate de phénylhydrazine exigeant une acidité assez considérable des liqueurs, j'ai essayé de le remplacer par le chlorhydrate de phénylhydrazine, ajouté après addition préalable d'acétate de soude, mais dans ces conditions la réaction est encore acide et de très nombreux essais m'ont donné des résultats identiques à ceux obtenus avec l'acétate.

Un argument en faveur de l'existence à l'état normal d'un produit susceptible de former une osazone avec la phénylhydrazine sans dédoublement préalable, peut être tiré de l'expérience suivante :

Si on filtre la solution dans laquelle a cristallisé l'osazone en

question, et qu'on reporte pendant une heure au bain-marie le tube dans lequel elle a pris naissance, on ne constate pas de nouvelle cristallisation en proportion appréciable, et cependant, comme nous le verrons ultérieurement, l'urine contient toujours un composé susceptible de fournir par action des acides minéraux cette même osazone. Si l'acide acétique possédait une action hydrolysante quelque peu intense, on devrait donc avoir une nouvelle formation de produit cristallisé.

Les expériences qui précèdent ayant toujours été exécutées sur des urines dont l'émission remontait à plusieurs heures, on pouvait se demander si les diastases normales de l'urine signalées par quelques auteurs ne pouvaient pendant ce temps avoir produit un commencement d'hydrolyse.

J'ai donc essayé la production d'osazone avec et sans défécation sur des urines fraîches. J'ai fait les mêmes expériences sur des urines mises au bain-marie bouillant dès leur émission dans le but de détruire les ferments qui s'y trouvent, et sur ces mêmes urines abandonnées vingt-quatre heures, soit à la température du laboratoire, soit à l'étuve à 38° en présence du thymol. Les résultats dans tous les cas ont été absolument identiques.

L'hypothèse de la formation d'un corps susceptible de donner une osazone sous l'action d'un ferment hydrolysant existant normalement dans l'urine est donc à rejeter.

II. — Action de la phénylhydrazine sur l'urine hydrolysée.

Ainsi que l'a indiqué Cammidge (voir page 28), certaines urines bouillies avec de l'acide chlorhydrique concentré, neutralisées par le carbonate de plomb et soumises à l'action de la phénylhydrazine en milieu acétique, donnent par refroidissement une osazone cristallisée.

Reprenant cette même technique, soit en l'exécutant à la lettre, soit en la modifiant, j'ai pu avec une centaine d'urines normales ou pathologiques, obtenir invariablement l'osazone caractéristique.

Le corps qui lui donne naissance existe donc normalement dans toutes les urines et ne saurait avoir aucune signification clinique. Perdant tout intérêt au point de vue médical, il n'en reste pas moins pour la physiologie un élément important par

sa présence constante et dont la détermination ne saurait être sans intérêt.

J'ai donc résolu d'en faire une étude aussi complète que possible.

J'ai essayé d'abord de déterminer les conditions les plus favorables à sa production.

1° *Action des acides.* — Dans sa première méthode, Cammidge opérait l'hydrolyse, qu'il prenait d'ailleurs pour une oxydation, en chauffant l'urine au bain de sable pendant dix minutes avec 1/10 d'acide chlorhydrique concentré. Cette méthode, beaucoup trop brutale d'ailleurs, et susceptible de détruire en partie tout au moins le composé formé, a été modifiée ultérieurement par son auteur lui-même, qui dans l'exposé de sa seconde technique emploie l'acide dans la proportion de 1/20 seulement.

Confiant dans les affirmations de Cammidge qui indiquait la glycérine comme étant l'origine de la réaction, j'avais essayé de substituer à l'acide chlorhydrique l'acide azotique, agent oxydant qui devait provoquer plus facilement, me semblait-il, la transformation de la glycérine en glycérose.

De nombreuses expériences que j'aurai l'occasion de relater m'ayant fait rejeter complètement l'hypothèse de Cammidge, j'ai aussitôt abandonné l'acide azotique dont l'action violemment oxydante ne peut qu'être nuisible dans les réactions délicates.

J'ai repris l'étude de l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique, en faisant varier les doses d'acide et le mode opératoire. J'ai employé des doses successivement croissantes de 1 à 10 °/₀ d'acide chlorhydrique concentré, avec une ébullition de dix minutes au bain de sable.

Avec une concentration de 2 °/₀ j'ai pratiqué l'hydrolyse à l'autoclave à 120° pendant un temps variable. Enfin j'ai utilisé l'action de l'acide chlorhydrique à 10 °/₀ au bain-marie pendant une heure

Dans toutes ces opérations, en neutralisant, comme l'indique Cammidge, l'acide chlorhydrique par du carbonate de plomb et faisant ensuite agir la phénylhydrazine, j'ai obtenu une osazone très nette, de même apparence cristalline que celle qui se forme dans les mêmes conditions avec l'urine non hydrolysée, mais trois à quatre fois aussi considérable. L'hydrolyse semble se faire aussi facilement avec l'acide chlorhydrique à 1 °/₀ qu'avec l'acide à 5 °/₀ et une ébullition de dix minutes au bain de sable. Au

delà de cette proportion, l'acide trop concentré altère plus ou moins le produit formé. A l'autoclave la dose de 2 °/₀ paraît la plus favorable avec une température de 120° pendant cinq minutes.

L'acide sulfurique, très employé comme hydrolysant des polysaccharides, a aussi été étudié dans les mêmes conditions et en faisant varier les doses de 2 °/₀₀ à 2 °/₀. La meilleure concentration paraît être celle de 1 °/₀, soit à l'autoclave à 120° pendant cinq minutes, soit à l'ébullition pendant dix minutes.

2° *Défécation.* — Les osazones obtenues directement sur l'urine elle-même après hydrolyse sont très nettes ; on les obtient cependant beaucoup plus pures en ayant soin de déféquer l'urine comme je l'ai indiqué plus haut, soit avant, soit après hydrolyse.

Si on a utilisé l'acétate neutre ou le sous-acétate de plomb, on peut hydrolyser après défécation avec l'acide chlorhydrique à 5 °/₀, sans s'inquiéter du précipité cristallin du chlorure de plomb qui prend parfois naissance, mais est facilement soluble à l'ébullition.

Avec l'acide sulfurique, il est nécessaire de faire préalablement l'hydrolyse, à cause du sulfate de plomb insoluble à froid comme à chaud.

La défécation au réactif de Patein et Dufau suivie d'hydrolyse peut être à la rigueur effectuée, mais il ne faut pas oublier que dans ce milieu chargé d'azotates l'addition d'acide, surtout à chaud, provoque la formation d'eau régale si on s'est servi d'acide chlorhydrique, ou de composés nitreux si l'on a utilisé d'autres acides. Ces produits très oxydants, s'ils ne détruisent pas en totalité le produit formé comme je m'en suis assuré, sont cependant capables de l'altérer en partie, et il est préférable d'éviter cette manière d'opérer.

Si l'on tient à se servir du réactif au nitrate mercurique, le mieux est de faire l'hydrolyse de l'urine par l'acide sulfurique à 1 °/₀ à l'autoclave à 120° pendant cinq minutes, de neutraliser par la soude et de faire ensuite la défécation suivant la technique ordinaire.

Si, pour diverses raisons, on veut préalablement opérer la défécation, je propose l'emploi, au lieu du réactif de Patein et Dufau, d'une solution à saturation d'acétate mercurique, qui donne comme déféquant de très bons résultats et n'a pas l'inconvénient d'introduire des azotates dans les liqueurs.

Ces diverses expériences prouvent en outre que le composé qui donne naissance à la réaction de Cammidge, pas plus que son produit d'hydrolyse, ne sont entraînés par les déféquants usuels.

3° *Neutralisation.* — La question de neutralisation de l'acide a joué un grand rôle dans l'étude de la réaction de Cammidge. Ham et Cleland[1] n'ont-ils pas prétendu que la réaction était produite par la combinaison de la phénylhydrazine et des sels de plomb employés à la neutralisation de l'acide chlorhydrique?

Bien que cette objection m'ait paru invraisemblable et qu'elle soit facile à réduire à néant par ce fait que le corps obtenu est d'origine purement organique, ne contient pas de plomb et se forme en quantité aussi abondante après élimination du plomb par l'hydrolyse sulfuré, j'ai voulu, comme l'avait d'ailleurs déjà fait Cammidge, étudier la valeur des neutralisants. J'ai employé, avec l'acide chlorhydrique, le carbonate de plomb; avec l'acide sulfurique, le carbonate de baryte; avec l'un et l'autre, la lessive de soude. Dans tous les cas, les résultats ont été les mêmes, et, comme il fallait d'ailleurs s'y attendre, le corps servant à la neutralisation n'a eu aucune influence sur le résultat.

III. — Étude de l'osazone.

Si on recueille avec soin l'osazone qui s'est formée après réaction de l'acétate de phénylhydrazine sur l'urine hydrolysée, et qu'après l'avoir lavée à l'eau, séchée dans le vide et traitée soigneusement par la benzine, on prenne son point de fusion, on obtient, au Bloc Maquenne, une fusion peu nette en général et voisine de 150°-152°; mais ce point, difficile à déterminer avec rigueur, oscille parfois dans des limites plus larges, c'est-à-dire descend quelque peu au-dessous de 150° et peut atteindre aussi près de 160°. Le produit qui fond d'une façon aussi irrégulière n'est sûrement pas pur.

En effet, en reprenant cette osazone par de l'acétone au demi ou de l'alcool méthylique, on voit que ces dissolvants, s'ils ne sont pas employés en proportion trop considérable, laissent un résidu d'osazone insoluble, tandis que par évaporation à l'air libre ils abandonnent de nouveaux cristaux qui, recueillis, lavés, séchés dans le vide et traités par la benzine, présentent un point de fusion, non plus d'environ 150°, mais de 135°-140°.

---

1. Ham et Cleland. *The Lancet* (1904), 14 mai et 11 juin.

La purification semble plus parfaite si on reprend l'osazone primitive par de l'eau bouillante au lieu d'employer l'acétone au demi, qui entraîne, avec l'osazone étudiée, une petite proportion de glucosazone rendue plus soluble par la présence de cette dernière. Il reste un résidu insoluble et le liquide filtré laisse par refroidissement cristalliser une osazone fondant également à 135°-137°; cette osazone d'ailleurs, purifiée par plusieurs recristallisations dans l'eau, voit son point de fusion s'abaisser et se fixer à 130°-132°.

Le produit primitif n'était donc qu'un mélange, et la preuve en est facilement faite par l'examen du résidu insoluble dans l'eau bouillante; celui-ci présente tous les caractères de la glucosazone et en particulier son point de fusion instantanée 230°-232°.

L'hydrolyse de l'urine a donc donné naissance à des substances différentes, l'une se transformant en glucosazone par sa combinaison phénylhydrazinique, l'autre encore inconnue donnant également une osazone; elle est le principal facteur de la réaction de Cammidge.

J'ai cherché à l'identifier avec les osazones déjà connues. Ses formes cristallines la rapprochaient de quelques-unes d'entre elles; en effet, sa forme dominante a quelque ressemblance avec la maltosazone et présente l'aspect de larges cristaux aciculaires groupés en étoiles ou de cristaux lamellaires réunis en rosettes. Quelquefois, on les confondrait aisément avec les cristallisations en oursins de la lactosazone. Enfin, elle peut prendre un aspect chevelu, une apparence épineuse, des formes de mousse. Son polymorphisme, commun d'ailleurs à beaucoup d'autres osazones, ne permet donc pas de tirer de ses cristallisations un grand secours. De plus, de nombreuses expériences m'ont démontré que les formes cristallines étaient, pour cette osazone comme pour les autres, sous la dépendance de nombreuses causes telles que la concentration des liqueurs, la lenteur du refroidissement, la nature des dissolvants, la présence dans les solutions d'éléments étrangers et d'impuretés diverses.

L'osazone purifiée et fondant à 130°-132°, est presque insoluble dans l'eau froide. Les liqueurs dans lesquelles elle a cristallisé gardent une coloration faiblement jaunâtre; mais évaporées dans le vide sulfurique, elles n'abandonnent aucun cristal et laissent un résidu insignifiant. Elle est beaucoup plus soluble dans l'eau bouillante, l'alcool à 95°, l'alcool méthylique, l'acétone, l'acétone

au demi, l'acide acétique cristallisable. Elle est très soluble dans l'éther acétique, la pyridine, même additionnée d'une assez forte proportion d'eau. Un mélange d'alcool méthylique et d'éther acétique, dans lequel on dissout l'osazone et auquel on ajoute ensuite une faible quantité d'eau, permet d'obtenir par évaporation des cristaux très nets. Il en est de même de la pyridine aqueuse qui l'abandonne en très beaux cristaux lamellaires fondant à 130°-132°.

Elle est insoluble dans la benzine, même à chaud, dans le toluène, le xylène, l'éther, l'éther de pétrole.

Son point de fusion n'est celui d'aucune des hexosazones actuellement caractérisées. Il est notablement inférieur à celui des pentosazones et hexobiosazones et ne correspond en somme à aucune osazone connue [1].

---

1. Grimbert et Bernier. *C R. Soc. de Biol.*, **66**, 1020 (1909).

CHAPITRE II

Essai de caractérisation du corps qui donne dans l'urine naissance à une osazone.

I. — Ses propriétés étudiées dans l'urine normale.

Les caractères de l'osazone que je viens de décrire ne permettant pas son identification, j'ai cherché à déterminer le corps qui lui donne naissance et ai examiné successivement ses propriétés les plus essentielles.

1° *Pouvoir réducteur*. — Le corps qui prend naissance dans l'hydrolyse de l'urine est réducteur. En effet, une urine qui, après défécation au réactif de Patein et Dufau, fournit un précipité d'oxyde de cuivre insignifiant avec la liqueur de Fehling, fraîchement préparée, donne, avec la même solution cuivrique, une réduction beaucoup plus abondante si elle a été préalablement hydrolysée.

La réduction cependant, si on opère avec l'urine même hydrolysée, n'est jamais suffisante pour entraîner la décoloration totale de la liqueur. Il ne faut pas s'en étonner, étant donné la faible quantité du composé existant normalement dans l'urine.

J'ai néanmoins évalué par des titrages la différence entre le pouvoir réducteur d'une urine avant et après hydrolyse et je me suis arrêté pour cela à la technique suivante :

a) 100 cm^3 d'urine sont additionnés de 50 cm^3 de réactif de Patein et Dufau, neutralisés et amenés à 200 cm^3.

La liqueur est filtrée et le mercure éliminé par le zinc.

b) 100 cm^3 de la même urine sont hydrolysés au bain de sable avec 5 °/₀ d'acide chlorhydrique à l'ébullition pendant dix minutes, ou à l'autoclave à 120° avec 1 °/₀ d'acide sulfurique pendant cinq minutes, neutralisés à la soude et déféqués au réactif nitromercurique comme précédemment.

Un essai préalable sur les deux liquides permet de préparer leur osazone, beaucoup plus abondante dans le second tube que dans le premier.

Pour effectuer le dosage, j'utilise la détermination par reste proposée par

Grimbert[1] pour les solutions sucrées très diluées, en me servant, dans les dosages à la liqueur de Fehling, de la modification Causse Bonnans au ferrocyanure de potassium.

Dans un ballon, on introduit 10 cm³ de liqueur de Fehling titrée, 5 cm³ d'une solution de ferrocyanure de potassium à 5 °/₀ et 10 cm³ de la solution *a* ou *b* et on porte à l'ébullition une minute. On fait ensuite couler goutte à goutte d'une burette graduée une solution de glucose préalablement titrée dans les mêmes conditions. La liqueur, de bleue qu'elle était, devient verte, puis jaune, et brusquement brunit en se troublant; c'est le terme de la réaction.

La différence entre les deux chiffres de glucose nécessaires pour obtenir le virage de la liqueur représente le pouvoir réducteur des 10 cm³ d'urine dédoublée, soit de 5 cm³.

A titre d'exemple, je citerai seulement les chiffres de deux expériences :

	Pouvoir réducteur en glucose. par litre.	
	Avant hydrolyse.	Après hydrolyse.
N° 1	0 gr. 524	1 gr. 179
N° 2	0 gr. 218	0 gr. 742

Le pouvoir réducteur de l'urine non hydrolysée peut sembler élevé au premier abord, mais j'ai démontré dans le chapitre précédent que la défécation au réactif nitromercurique avait une action hydrolysante très marquée. J'ai été réduit à l'employer néanmoins, les sels de plomb entraînant imparfaitement un certain nombre de composés normaux de l'urine, tels que l'acide urique, la créatinine, éléments qui ont une réelle action sur la liqueur de Fehling et faussent sensiblement les résultats dans un dosage par reste, ainsi que je m'en suis assuré.

Une objection plus grave peut être faite aux chiffres obtenus avec l'urine hydrolysée. J'ai également démontré dans le chapitre précédent qu'on obtenait après hydrolyse de l'urine de la glucosazone accompagnée d'une osazone inconnue. L'augmentation du pouvoir réducteur pourrait donc être attribuée à la formation de glucose.

A cette objection, je répondrai que si le glucose formé participe à l'augmentation du pouvoir réducteur, il n'est cependant pas le seul corps en cause, et ceci m'amène à parler d'une autre propriété du composé étudié.

---

1. Guiart et Grimbert. *Diagnostic chimique, microscopique et parasitologique*, 2ᵉ édition (1908), p. 289.

2° *Pouvoir fermentescible.* — L'urine recueillie aseptiquement dans un vase stérile, additionnée de levure fraîche, et maintenue deux jours à la température de 25° à 30° donne, dans les conditions que j'ai indiquées, la même osazone parfaitement cristallisée. Le corps qui donne naissance à cette osazone n'est donc pas fermentescible.

Bien plus, l'addition de levure à l'urine a dû détruire le glucose ou le corps qui le forme par hydrolyse et l'osazone recherchée doit avoir le même point de fusion avant et après l'action des acides.

L'expérience suivante me permet de démontrer cette hypothèse.

De l'urine est maintenue comme plus haut deux jours en contact avec de la levure ; on s'assure après ce temps qu'elle n'a pas subi de fermentation ammoniacale et on la divise en deux parties.

L'une est déféquée au réactif nitromercurique et donne une osazone peu abondante fondant à 135°-137°.

L'autre est hydrolysée à l'autoclave avec l'acide sulfurique à 1 °/₀, neutralisée et déféquée dans les mêmes conditions. Son osazone est beaucoup plus abondante que dans le tube précédent et présente également un point de fusion de 135°-137°, prouvant ainsi que le point de fusion de 150° environ observé avec les osazones obtenues dans les urines hydrolysées et non soumises à l'action de la levure de bière est bien dû à la présence du glucosazone. Il en découle en outre que l'augmentation du pouvoir réducteur d'une urine après action des acides est dû non seulement au glucose, mais également au composé qui a pris naissance par hydrolyse.

Les fermentations microbiennes qui se produisent rapidement dans les urines ne sont pas, comme la levure de bière, sans action. Une urine quelque peu fermentée et même déjà de réaction ammoniacale fournit encore une osazone caractéristique par hydrolyse; mais le composé obtenu va en diminuant progressivement, à mesure que la fermentation ammoniacale s'accroît, et finit par disparaître. L'hydrate de carbone, son générateur, est devenu la proie des bactéries; aussi sa recherche doit-elle s'effectuer sur l'urine aussi fraîche que possible, à moins qu'elle n'ait été additionnée d'un antiseptique.

3° *Pouvoir rotatoire.* — L'examen de l'urine avant et après hydrolyse ne donne, au point de vue polarimétrique, que des

déviations fort peu sensibles et difficiles à déterminer dans les liqueurs colorées.

Nous laisserons donc de côté, pour le moment, cette propriété, nous réservant d'en faire au cours de ce travail une étude plus complète. (Voir p. 98 et 100).

4° *Action des déféquants.* — Nous avons vu précédemment que le corps qui fournit l'osazone dans l'urine normale n'était pas entraînable par les déféquants habituels.

L'acétate de plomb ammoniacal, au contraire, ainsi que je m'en suis assuré, le précipite complètement comme il le fait d'ailleurs de tous les sucres.

5° *Essais d'identification.* — Les analogies présentées par le composé étudié et les sucres réducteurs étaient suffisamment grandes pour permettre de le rapprocher de ce groupe.

Néanmoins, des osazones peuvent être formées par des corps tels que les dicétones ou même par des aldéhydes-alcools qui ne font point partie de la classe des sucres; je me suis assuré que le corps en question n'était point volatil comme le sont beaucoup de ces composés, car les liqueurs distillées donnaient avec la phénylhydrazine une réaction absolument négative.

Wilcox[1], en évaporant à siccité de l'urine au bain-marie et épuisant le résidu par l'alcool absolu n'a pu obtenir après évaporation de l'alcool, reprise par l'eau et traitement à la phénylhydrazine, aucune osazone, et il en avait conclu que le corps examiné était insoluble dans l'alcool absolu.

Différentes hypothèses ayant été émises sur la nature des corps qui peuvent, dans l'urine, se combiner à la phénylhydrazine, j'ai cru bon d'en faire à nouveau l'examen.

L'urée étant susceptible de fournir des composés cristallisés avec la phénylhydrazine, j'ai repris les travaux d'Hugo Milrath que j'ai décrits page 25 et me suis assuré à nouveau, bien que la chose ne parût pas douteuse, qu'une solution d'urée, de même concentration que l'urine, ne fournit jamais aucun cristal, pas même de phénylsemicarbazide, si on lui fait subir les mêmes traitements qu'à l'urine pour obtenir l'osazone caractéristique.

Comme nous l'avons déjà vu, Cammidge attribuait sa réaction à la présence de glycérine; or, si l'on traite exactement dans les

---

1. Wilcox. *The Lancet* (1904), July 23, 211.

mêmes conditions que celles qu'il a indiquées une solution de glycérine à 2 °/₀, on n'obtient jamais trace de glycérosazone. Il en est de même si on ajoute de la glycérine à une urine et si l'on fait des réactions comparativement avec une urine qui n'a subi aucune addition. Les cristaux d'osazone ne sont pas plus abondants dans un cas que dans l'autre. D'ailleurs, l'acide chlorhydrique est parfaitement impuissant à oxyder la glycérine et à la transformer en glycérose. Comme je l'ai déjà signalé, j'ai voulu lui substituer l'acide azotique à même concentration, mais sans résultat.

J'ai, d'autre part, préparé du glycérose en oxydant la glycérine par l'acide azotique étendu d'après la méthode de Fischer et Tafel[1] et ai pu obtenir de la glycérosazone.

Cette osazone, ainsi que Bertrand[2] l'a démontré, fond à 142° au bloc Maquenne et elle diffère de l'osazone étudiée par plusieurs autres caractères.

La gomme animale, la glucosamine, les jécorines, le maltose, l'isomaltose, le saccharose, le glucose, le lévulose, tour à tour mis en jeu pour expliquer la réaction de Cammidge n'y interviennent cependant en aucune façon, puisque tous directement ou par hydrolyse, donnent, avec les sels de phénylhydrazine, de la glucosazone.

On ne peut cependant songer au lactose dont l'osazone fond à 213°, ni aux pentoses dont les points de fusion d'osazone sont aussi très différents.

II. — Réactions du composé générateur d'osazone en solution concentrée.

Jugeant fort difficile d'étudier directement un corps qui se trouve en aussi faibles proportions dans l'urine, j'ai tenté sinon de l'isoler, du moins de l'obtenir en solution suffisamment concentrée pour permettre d'établir ses réactions et si possible son identification.

1° *Concentration des liqueurs*. — Le premier moyen qui s'offrait à moi et le plus simple était d'évaporer directement l'urine. J'ai dû y renoncer, la proportion des substances dissoutes dans ce

1. Fischer et Tafel. *Ber. chem. Ges.*, **20**, 1088 (1887).
2. Bertrand. *C. R. Ac. des Sc.*, **126**, 842 (1898) et *Bull. Soc. Chim.* (3), **19**, 502 (1898).

liquide étant trop grande pour permettre une concentration suffisante.

Une évaporation à siccité suivie d'une reprise par l'alcool ou par des dissolvants appropriés n'était guère plus pratique, car une grande partie des constituants de l'urine était soluble dans ces dissolvants.

La concentration dans le vide après défécation au nitrate mercurique donne aussi de mauvais résultats, car les liqueurs ainsi traitées sont fortement chargées d'azotate de soude et la présence de ce sel trouble toutes les réactions qu'on peut tenter de faire ultérieurement en milieu acide.

2° *Précipitation à l'état de combinaison insoluble.* — Alors j'ai songé à séparer le corps étudié sous forme de composé insoluble, et j'ai mis à profit pour cela sa précipitation par l'acétate de plomb ammoniacal.

A. — Première méthode. — Après défécation par la solution de Courtonne ou le sous-acétate de plomb liquide en excès, l'urine filtrée était additionnée d'un excès d'ammoniaque, environ 50 gr. par litre, et le précipité qui en résultait lavé à l'eau ammoniacale et recueilli à la trompe. Ce précipité était ensuite mis en suspension dans l'eau distillée et traité par un courant d'hydrogène sulfuré à saturation. Ainsi débarrassé du plomb, le liquide filtré, concentré dans le vide, réduisait légèrement la liqueur de Fehling et reproduisait l'osazone caractéristique. Après hydrolyse, la réduction était plus intense et l'osazone formée plus abondante.

Mais cette façon d'opérer ne va pas sans quelques inconvénients; les filtrations sont longues, les précipités obtenus avec 40 litres d'urine environ sont volumineux et exigent, pour permettre le passage de l'hydrogène sulfuré, d'être mis en suspension dans une quantité assez élevée d'eau distillée. De plus, pour obtenir la décomposition intégrale du composé plombique, il faut maintenir le courant gazeux pendant un temps assez considérable et une seule opération est insuffisante, ainsi que je m'en suis assuré.

Le précipité doit donc être délayé à nouveau dans l'eau distillée et soumis une seconde et même une troisième fois à l'action du gaz sulfhydrique. Les liqueurs se trouvent ainsi assez diluées, et il devient nécessaire de les concentrer.

Or, cette concentration, même opérée dans le vide, à basse température, fait prendre au liquide une coloration assez foncée, rendant fort difficiles les examens polarimétriques ultérieurs. Dans le but d'éviter cette coloration, j'ai fait l'évaporation en présence

de carbonate de chaux ou de carbonate de baryte afin de neutraliser l'acidité; le produit final n'en était que plus coloré.

En outre, les liqueurs dans lesquelles on a fait passer l'hydrogène sulfuré présentent, ce qui est très gênant, une réaction fortement acide, comme l'avaient déjà remarqué Mayer et Neuberg[1]. Hervieux[2] a, il est vrai, proposé l'addition de carbonate de potasse pour maintenir le milieu neutre pendant le passage du courant gazeux.

Enfin l'hydrogène sulfuré est doué de propriétés réductrices assez intenses et j'ai craint qu'elles ne fussent pas sans action sur le composé étudié.

Réservant donc ces liquides à l'extraction de quantités appréciables d'osazone, je me suis appliqué à mettre en pratique un procédé présentant moins d'inconvénients.

B. — Deuxième méthode. Trente litres d'urine normale ont été déféqués avec 1/10 de réactif de Courtonne, filtrés, et le filtrat additionné d'ammoniaque dans la proportion de 50 gr. par litre. Le précipité obtenu a été lavé à l'eau ammoniacale par décantations successives, recueilli à la trompe, et lavé à nouveau. J'ai essayé de substituer, pour la précipitation du plomb, l'acide sulfurique à l'hydrogène sulfuré. Encouragé par quelques essais préalables suivis de bons résultats, j'ai délayé le précipité obtenu dans de l'acide sulfurique au 1/10 ajouté jusqu'à réaction légèrement acide, et j'ai maintenu le contact pendant quelques jours pour assurer une précipitation complète. Après ce temps, l'acidité correspondait à 0,147 d'acide sulfurique par litre, le volume total était de 2 litres environ, et la liqueur filtrée suffisamment peu colorée pour permettre des déterminations polarimétriques.

Ce liquide donnait une osazone fondant à 136°-137° et, après hydrolyse, un produit beaucoup plus abondant, de même cristallisation et présentant un point de fusion de 145° environ.

Le pouvoir réducteur exprimé en glucose et déterminé d'après la méthode décrite page 47 correspondait :

Avant hydrolyse	à 1 gr. 573
Après hydrolyse	à 2 gr. 971

Le pouvoir rotatoire déterminé au tube de 25 déc. après défécation avec 1/10 de réactif de Courtonne, pour obtenir des solutions parfaitement incolores, était lévogyre et devenait dextrogyre par ébullition avec les acides.

Ces deux dernières propriétés, ainsi que celle de ne pas fer-

1. Mayer et Neuberg. *Zeit. phys. Chem.*, 29. 256 (1900).
2. Hervieux. *Thèse* Doct. ès sciences, Paris (1908), 107.

menter par la levure de bière, pouvaient laisser supposer la présence dans le liquide de conjugués glycuroniques.

Cette supposition d'ailleurs vraisemblable par suite de la technique adoptée qui avait pu entraîner l'acide glycuronique dans la précipitation par l'acétate de plomb ammoniacal, me semblait cependant peu digne d'intérêt. En effet, les pouvoirs réducteurs et les propriétés optiques de la solution paraissaient marcher de pair avec la production d'osazone; or, de nombreux auteurs que j'aurai ultérieurement l'occasion de citer ont affirmé que l'acide glycuronique donnait avec la phénylhydrazine des composés mal définis et sans aucune ressemblance avec l'osazone obtenue. De plus, sur la foi des traités classiques, je considérais l'acide glycuronique comme entièrement précipitable par le sous-acétate de plomb, et nous avons vu que l'emploi de ce réactif n'empêchait en aucune façon la formation d'osazone.

Devant ces faits, je résolus néanmoins de vérifier la présence dans le liquide d'acide glycuronique, me réservant de déterminer ultérieurement s'il intervenait dans les réactions ou coexistait seulement avec le composé étudié.

3° *Caractérisation de l'acide glycuronique.*

A. — **Réactions communes aux pentoses et à l'acide glycuronique.**

1° *Réaction du furfurol* [1-2]. 25 cm^3 de liquide ont été additionnés de 25 cm^3 d'acide chlorhydrique de $D = 1{,}06$ et distillés. D'autre part, j'ai préparé une solution d'acétate d'aniline d'après la formule donnée par Hervieux [3] :

Aniline incolore	5 cm^3
Acide acétique.	2 —
Eau.	5 —
Alcool à 95°	5 —

Le distillat additionné de quelques centimètres cubes de ce réactif donne une belle coloration rouge se développant instantanément.

Cette réaction est très sensible, que l'on emploie l'acétate

1. Mann et Tollens. *Liebig's. Ann. chem.*, **290**, 157 (1896).
2. Gunther, de Chalmot et Tollens. *Ber. chem. Ges.*, **23**, 1751 (1890) et **25**, 2569 (1892).
3. Hervieux. *Thèse* Doct. ès sciences. Paris (1908), 120.

d'aniline, le salicylate d'aniline ou la métaxylidine préconisée par Schiff[1] (Hervieux), mais elle a l'inconvénient de ne pas être exclusivement caractéristique des pentoses et de l'acide glycuronique, et de se produire aussi, mais d'une façon moins intense, avec le glucose, le saccharose et d'autres sucres.

2° *Réaction de* Molisch[2]. — Cette réaction est obtenue quand on additionne le liquide étudié d'une solution sulfurique de naphtol α. Il se développe une coloration rouge violacé lorsqu'on opère sur des liqueurs très diluées. Ainsi que l'a démontré Udransky[3], cette réaction est due également à la formation de furfurol et se produit non seulement avec les sucres, mais encore avec les matières albuminoïdes et les gommes.

3° *Réaction de* Nicolas[4]. — C'est encore à la production de furfurol par action de l'acide chlorhydrique sur l'acide glycuronique qu'est due cette réaction récemment proposée pour la recherche des conjugés glycuroniques dans l'urine.

Par suite de ses propriétés aldéhydiques, le furfurol est susceptible de se combiner à l'indoxyle en formant une indogénide dont les solutions dans le chloroforme, la benzine et surtout le sulfure de carbone présentent une fluorescence verte.

J'ai fait cette expérience directement avec le liquide étudié qui ne contenait pas d'indoxyle et n'ai obtenu aucune fluorescence dans le sulfure de carbone.

J'ai alors additionné le liquide de quelques centimètres cubes d'une urine fortement chargée en indoxyle et ai pu constater une fluorescence verte très nette.

4° *Réaction de* Bela *de* Bitto[5]. — J'ai utilisé pour cette réaction une solution saturée dans l'alcool de métadinitrobenzène.

Le liquide examiné a été additionné de volume égal de cette solution et d'une goutte de lessive de soude et chauffé. Il se fait une coloration rouge, puis violette de la masse entière. La même réaction se produit d'ailleurs avec une solution d'acide glycuronique pure ou une solution d'arabinose à 1/50.

5° *Réaction de* Tollens *à la phloroglucine*[6]. — Le liquide à

1. Schiff. *Ber. chem. Ges.*, **20**, 540 (1888).
2. Molisch. *Monatsch. Chem.*, **7**, 198 (1886).
3. Udransky. *Zeit. phys. Chem.*, **12**, 358 et 385 (1888).
4. Nicolas. *C. R. Soc. Biol.*, **61**, 149 (1906), 28 juillet.
5. D'après Hervieux, *Thèse* Doct. ès sciences, Paris (1908) 118.
6. Tollens. *Annal. der Chem.*, **254**, 329 (1889), et *Ber. chem. Ges.*, **29**, 1202 (1896).

essayer est additionné dans un tube à essai de volume égal d'acide chlorhydrique de D = 1,19, de quelques centigrammes de phloroglucine et porté au bain-marie bouillant. S'il se produit un trouble, on refroidit rapidement le tube et on recueille le précipité par centrifugation. On le lave à l'eau, on le dissout dans l'alcool à 95° et on examine au spectroscope. Il est plus simple, après refroidissement, d'agiter le mélange avec de l'alcool amylique qui se colore en rouge foncé en présence de l'acide glycuronique et des pentoses et donne au spectroscope une bande d'absorption entre le jaune et le vert, entre les raies D et E. (NEUBERG [1]).

D'après SALKOWSKI [2], il se ferait une coloration rouge devenant peu à peu vert sombre avec les pentoses et brune avec l'acide glycuronique. Mais cette distinction me semble difficile à apprécier.

6° *Réaction de* BIAL *à l'orcine.* — D'abord donnée par TOLLENS [3-4], cette réaction a été modifiée ensuite par BIAL [5].

On prépare le réactif suivant [6] :

Orcine pure.	1 gr.
Acide chlorhydrique.	500 cm³
Solution de perchlorure de fer officinale. . .	XXV gouttes

On porte à l'ébullition volumes égaux de réactif et de liquide à essayer. Quelques auteurs préfèrent chauffer à l'ébullition 5 cm³ du réactif dans un tube à essai et y laisser tomber quelques gouttes, au minimum 1 cm³ du liquide étudié. Il se forme un précipité foncé qu'on peut séparer par centrifugation. On peut également le dissoudre dans l'alcool amylique par simple agitation après addition d'eau pour faciliter la séparation des liquides. La solution amylique est colorée en vert plus ou moins foncé et présente au spectroscope une bande d'absorption entre le rouge et le jaune, entre les raies C et D et parfois une deuxième bande au commencement du rouge et une bande dans le vert lorsqu'on a employé un excès d'orcine.

D'après KRAFT [7], la réaction se produirait à une température

1. NEUBERG. *Zeit. phys. Chem.*, **31**, 564 (1901).
2. SALKOWSKI. *Berlin. klin. Wochenschr.*, 1895, n° 17.
3. TOLLENS et WHEELER. *Ber. chem. Ges.*, **22**, 1046 (1889).
4. TOLLENS. *Annal. der Chem.*, **260**, 304 (1890).
5. BIAL. *Beitrag. Chem. Phys*, **2**, 532, et **3**, 528 (1903), et *Zeit. phys. Chem.*, **45**, 258 (1905).
6. BIAL. *Biochem. Centralb.*, **1**, 664 (1903).
7. KRAFT. *Apoth. Zeitung* (1906), 611.

relativement peu élevée avec les pentoses et seulement à l'ébullition avec l'acide glycuronique. Cette distinction subtile me semble, après de nombreux essais, difficile à admettre.

Van Leersum [1], prétend que toutes les urines donnent directement la réaction ainsi que des solutions de glucose à 0, 10 °/₀ et que le réactif de Bial ne peut être employé pour la recherche de l'acide glycuronique que dans des conditions bien déterminées.

Avec le liquide que j'étudiais, j'ai pu obtenir d'une façon intense les réactions à la phloroglucine et à l'orcine, mais je n'ai pu établir si elles étaient dues aux pentoses ou à l'acide glycuronique.

B. — Réactions caractéristiques de l'acide glycuronique.

1° *Combinaison avec la parabromophenylhydrazine.* — Neuberg [2] a le premier proposé ce composé pour la caractérisation de l'acide glycuronique et employait le chlorhydrate de parabromophénylhydrazine en présence d'acétate de soude. Hervieux a remplacé le chlorhydrate par la base en milieu acétique et prétend arriver aux mêmes résultats. Voici d'ailleurs la technique qu'il préconise [3] :

On ajoute à la liqueur déféquée au réactif nitromercurique de la parabromophénylhydrazine fraîchement préparée et de l'acide acétique cristallisable, à raison d'une goutte par centimètre cube. On porte quelques secondes au bain-marie bouillant en agitant vigoureusement et on filtre. La filtration a pour but de séparer l'excès d'hydrazine non utilisée ; on reporte le filtrat d'un beau jaune clair au bain-marie. Rapidement quand les liqueurs sont concentrées, lentement dans les autres cas, on voit se former des flocons cristallisés, jaune-serin, qui se rassemblent par refroidissement ou par centrifugation, le liquide limpide est remis de nouveau au bain-marie et on recommence trois fois la même opération.

On a finalement, dans le tube de la centrifugeuse un culot jaune clair, qu'on lave immédiatement avec de l'alcool absolu froid, puis bouillant, tant que l'alcool se colore en jaune afin d'enlever la parabromophénylhydrazine en excès et la bromaniline qui a pu se former.

Il est bon de ne pas ajouter un excès d'acide acétique qui entraverait la cristallisation et d'opérer rapidement et sans tarder les lavages à l'alcool.

La combinaison cristallisée obtenue est insoluble dans l'eau

1. Van Leersum. *Beit. chem. Phys. u. Pathol.*, **5**, 510 (1904).
2. Neuberg. *Ber. chem. Ges.*, **32**, 2395 (1899).
3. Hervieux. *Thèse* Doct. ès sciences, Paris (1908), 126.

froide, l'eau bouillante, l'alcool absolu bouillant, l'éther, la benzine, le chloroforme, l'éther acétique, l'alcool amylique, très soluble dans la pyridine. Elle fond à 235°-236° par fusion instantanée.

Dissoute dans un mélange de 4 cm^3 de pyridine et 6 cm^3 d'alcool absolu, elle possède une forte rotation lévogyre $\alpha_D = -369°$.

Le corps obtenu dans cette combinaison a été considéré par ses auteurs comme une hydrazone, les composés se combinant molécule à molécule ainsi que l'a montré le dosage du brome. Hervieux [1] cependant prétend que si ce composé se produit d'une façon transitoire dans la réaction, il est suivi de la formation de l'amide interne, ce qui fait du corps obtenu une lactazame et non une hydrazone.

Le liquide dans lequel je recherchais l'acide glycuronique, après avoir été hydrolysé, neutralisé et déféqué au réactif de Patein et Dufau, a été traité par la parabromophénylhydrazine dans les proportions suivantes :

Liquide déféqué	50 cm^3
Parabromophénylhydrazine.	0 gr. 80
Acide acétique.	LXXX gouttes

J'ai suivi la technique décrite par Hervieux. (Cet auteur dans la description de son procédé considère la parabromophénylhydrazine comme un liquide, j'ai toujours eu entre les mains des échantillons cristallisés.) Ce composé fond en effet à 105° (Elsinghorst) [2] ou 106° (Neufeld) [3].

J'ai obtenu une cristallisation abondante en partie soluble dans l'alcool absolu, mais dont la partie insoluble fondait très nettement à 235°-236° au bloc Maquenne.

J'ai également cherché à obtenir la combinaison parabromophénylhydrazinique avec des urines préalablement hydrolysées et donnant avec la phénylhydrazine l'osazone caractéristique. J'ai obtenu par refroidissement une cristallisation blanche abondante très analogue à la phénylsemicarbazide formée dans l'action prolongée de la phénylhydrazine sur l'urée à l'ébullition. Ces cristaux sont insolubles dans l'eau froide, solubles dans l'eau bouillante d'où ils cristallisent par refroidissement. Lavés à l'al-

1. Hervieux. *Thèse* Doct. ès sciences, Paris (1908), 130.
2. Elsinghorst. *Inaug. Diss.*
3. Neufeld. *Ann. Chem.*, **248**, 95 (1888).

cool dilué, puis à l'alcool à 95°, à l'éther et séchés, ils fondent au bloc MAQUENNE vers 240°.

J'ai pensé que cette combinaison devait être due à la présence de l'urée et j'ai repris cette même réaction avec une solution d'urée à 3 °/₀. J'ai obtenu les mêmes cristallisations en choux-fleurs, présentant un même point de fusion. Ce corps semble donc être de la parabromophénylsemicarbazide.

Le réactif de PATEIN précipitant en grande partie l'urée, j'ai essayé de faire réagir la parabromophénylhydrazine sur l'urine hydrolysée et déféquée, j'ai obtenu quelques cristaux blancs en choux-fleurs provenant de l'urée qui n'avait pas été éliminée complètement, mais aucune cristallisation de la combinaison parabromophénylhydrazinique.

La formation de cette combinaison cristallisée à point de fusion voisin de la lactazame d'HERVIEUX pourrait prêter à confusion, mais la couleur des deux corps suffit amplement à les distinguer. Il est bon cependant de n'opérer la recherche de l'acide glycuronique que sur des liquides ne contenant pas d'urée, soit qu'elle ait été en grande partie éliminée par le réactif de PATEIN, soit que l'on ait préalablement séparé l'acide glycuronique par l'acétate de plomb ammoniacal.

2° *Réaction de Tollens à la naphtorésorcine.* — TOLLENS et RORIVE [1-2] ont obtenu dans la condensation de sucres divers avec la naphtorésorcine ou 1-3 dioxynaphtaline des produits colorés offrant un spectre d'absorption caractéristique.

On chauffe à ébullition, dans un tube à essai, quelques parcelles de sucre à essayer et de naphtorésorcine avec 10 cm³ d'un mélange à volumes égaux d'eau et d'acide chlorhydrique de $D = 1,19$. On fait bouillir une à trois minutes, après quelques instants on refroidit sous un courant d'eau, on recueille le précipité qui s'est formé sur un filtre, on le lave à l'eau et on le dissout dans l'alcool à 95°. On obtient un liquide très coloré et d'une fluorescence verte très prononcée.

Les différents sucres donnent des solutions en général bleues à fluorescence plus ou moins intense, avec spectre d'absorption variable.

La réaction est surtout intéressante pour la recherche de l'acide

---

1. TOLLENS et RORIVE. *Ber. chem. Ges.*, **41**, 1783 (1908).
2. TOLLENS. *Ber. chem. Ges.*, **41**, 1788 (1908).

glycuronique. En effet, toutes les substances colorantes formées sont insolubles dans l'éther, tandis que le produit de la réaction de l'acide glycuronique s'y dissout en le colorant en bleu.

Voici la technique de Tollens :

Dans un tube à essai on introduit 5 cm³ du liquide étudié, 1/2 à 1 cm³ d'une solution alcoolique de naphtorésorcine à 1 °/₀ et un volume d'acide chlorhydrique concentré (D. = 1,19) égal à celui du liquide déjà contenu dans le tube. On chauffe à l'ébullition, on laisse bouillir pendant une minute, on met le tube de côté, et après quatre minutes on le refroidit sous un courant d'eau; on y verse un volume d'éther égal à celui du liquide, on agite fortement, et après séparation des liquides on fait l'examen spectroscopique.

Avec l'acide glycuronique pur ou ses conjugués l'éther se colore en bleu, la coloration passe au violet et même au rouge en présence d'impuretés et surtout des sucres, arabinose, xylose, glucose, etc.; mais elle reste toujours belle. La réaction est encore très marquée, d'après l'auteur, avec une dilution de 0,01 °/₀.

Au spectroscope on aperçoit une bande sur la raie D, mais il est nécessaire de n'avoir pas une coloration trop intense. Le liquide aqueux présente en général une fluorescence verte très marquée; il n'y a pas lieu d'en tenir compte dans la réaction.

Je me suis assuré de la sensibilité de ce procédé en opérant sur de l'acide euxanthique et avec des solutions très diluées d'acide glycuronique.

Je l'ai essayé également sur les divers sucres en suivant exactement la même technique. Comme l'a indiqué Tollens, on obtient avec tous un précipité bleuâtre, soluble dans l'alcool, insoluble dans l'éther qui après agitation se sépare incolore ou à peine teinté en brun si on a opéré sur des doses massives de produit.

J'ai également substitué à l'éther d'autres dissolvants : la matière colorante semble moins soluble dans le chloroforme que dans l'éther, et à peine dans la benzine; elle ne se dissout pas dans le sulfure de carbone et donne avec l'alcool amylique une solution bleue virant presque aussitôt au rouge foncé, puis au brun, et la bande d'absorption se trouve reportée vers la droite.

J'ai songé à essayer cette réaction sur les osazones elles-mêmes au lieu des sucres; on obtient avec toutes un éther très coloré en violet rougeâtre, ce qui était d'ailleurs à prévoir par suite de l'action de l'acide chlorhydrique sur l'osazone.

En opérant de la même façon avec une solution de peptone à 1 °/₀, l'éther se colore en rose pâle; il en est de même avec les albumines. Les pigments biliaires ne donnent rien.

Dans toutes ces opérations, comme dans toutes les réactions colorées précédentes, il est nécessaire d'opérer sans défécation préalable au réactif nitromercurique; en effet, l'action de l'acide chlorhydrique sur l'azotate de soude dégage des vapeurs nitreuses qui détruisent les couleurs ou les modifient complètement.

Mandel et Neuberg[1] ont prétendu que cette réaction de Tollens ne serait pas absolument caractéristique de l'acide glycuronique. Je ne l'ai jamais vue en défaut.

J'ai effectué sur le liquide qui m'avait servi à obtenir la combinaison parabromophénylhydrazinique, cette réaction à la naphtorésorcine, et j'ai obtenu une solution colorée en rouge-violet intense, avec une bande obscure un peu à droite et sur la raie D.

Le liquide provenant de la précipitation des urines par l'acétate de plomb ammoniacal, et décomposition du précipité plombique par l'acide sulfurique dilué m'a permis d'obtenir toutes les réactions précédentes. Je suis donc en droit de conclure à la présence d'acide glycuronique dans ce liquide. Cette présence d'acide glycuronique en quantité notable coïncide avec une formation abondante d'osazone. Nous examinerons si nous devons voir dans ces faits une relation.

III. — Isolement du composé générateur d'osazone.

L'obtention simultanée de l'osazone et des réactions que je viens de décrire pouvait n'être qu'une coïncidence et non une conséquence de la présence d'acide glycuronique dans le liquide. Je me suis donc proposé d'isoler le corps qui donnait naissance à l'osazone.

A. 1re *Méthode.* — J'ai cherché à appliquer à l'urine le procédé indiqué par Tanret [2], pour l'isolement du stachyose dans les crosnes, et bien souvent mis en œuvre depuis.

Trois litres d'urine ont été hydrolysés par l'acide chlorhydrique et neutralisés par le carbonate de plomb. Ils ont été ensuite déféqués au sous-acétate de plomb jusqu'à cessation de précipitation. Le liquide filtré a été débarrassé du plomb par l'acide sulfurique au 1/10 ajouté en aussi faible quantité que possible. Le filtrat, après toutes ces opérations, occupe un volume de quatre litres. Il a été concentré dans le vide à 1200 cm^3. Ce liquide donne très nettement l'osazone. Il a été trituré avec 100 gr. d'hydrate de baryte, filtré et

---

1. Mandel et Neuberg. *Biochem. Zeit.*, **13**, 148 (1903).
2. Tanret. *Bull. Soc. Chim.* (3), **29**, 889 (1903).

additionné de 2 volumes d'alcool. Aucun précipité ne s'est produit instantanément, et l'opération n'a pu être utilement poursuivie.

La proportion du composé étudié est donc trop faible pour essayer de l'isoler sans concentration préalable.

B. 2ᵉ *Méthode.* — Désireux d'utiliser la méthode de Tanret, je lui ai fait subir quelques modifications dans le but d'opérer sur une quantité appréciable de produit.

Dans un essai préalable j'ai, après défécation au réactif de Courtonne, hydrolysé et neutralisé un litre d'urine. La liqueur filtrée a été additionnée d'acétate de plomb ammoniacal, et le précipité traité par l'acide sulfurique au 1/10 jusqu'à réaction acide. Ce liquide, neutralisé ensuite à chaud par le carbonate de baryte et soumis à l'action de l'acétate de phénylhydrazine, donne une osazone abondante.

L'acide sulfurique décompose donc facilement le composé plombique insoluble, en donnant du sulfate de plomb et en mettant en liberté le corps recherché.

J'ai introduit cette modification dans la méthode de Tanret, et ai repris en grand cette technique.

Vingt litres d'urine ont été déféqués à l'acétate neutre de plomb, puis hydrolysés par l'acide chlorhydrique ; après neutralisation par le carbonate de plomb, le liquide filtré a été additionné d'un léger excès d'acétate de plomb et d'ammoniaque. Le précipité ammoniacal a été décomposé par l'acide sulfurique au dixième. Le volume obtenu est de 1500 cm³. (Une petite portion neutralisée par le carbonate de baryte donne une osazone abondante.) Le liquide a été trituré avec 150 gr. d'hydrate de baryte et, après filtration, additionné de deux fois son volume d'alcool à 95° qui a déterminé un précipité abondant. Ce précipité recueilli et délayé dans l'eau a été soumis à l'action prolongée d'un courant d'acide carbonique dans le but de séparer la baryte à l'état de carbonate.

La solution filtrée est neutre, elle réduit la liqueur de Fehling, donne au polarimètre une déviation de + 0° 8′ à + 0° 10′, et produit l'osazone en cristaux caractéristiques. Concentrée dans le vide, elle se trouble par suite de la décomposition à chaud du bicarbonate de baryte qui s'y trouvait dissous. Après élimination du carbonate de baryte par filtration, cette liqueur donne encore les réactions du baryum. L'évaporation a été continuée dans le vide jusqu'à siccité et le résidu repris à l'ébullition pendant une demi-heure, successivement par 50 cm³. cubes d'alcool à 95°, à 90°, à 85°, à 80°, à 70°. Le résidu de ces traitements, dissous dans l'eau, ne donne plus lieu à la formation d'osazone.

Les solutions alcooliques filtrées à l'ébullition et abandonnées à elles-mêmes ont laissé déposer sur les parois des vases de petits cristaux dont le volume et le nombre ont sensiblement augmenté pendant quelques jours.

Les cristaux obtenus dans l'alcool à 80° ont permis d'obtenir avec l'acétate de phénylhydrazine l'osazone caractéristique.

La solution aqueuse des cristaux qui se sont formés dans l'alcool à 85° donne de façon très intense la réaction de Tollens à la naphtorésorcine, l'éther étant coloré en violet très pur et montrant la raie spectroscopique déjà indiquée.

Le liquide aqueux qui a servi à exécuter la réaction de Tollens a été évaporé à siccité, calciné légèrement à cendres blanches et repris par l'eau. Ce liquide filtré est neutre et il précipite abondamment par les solutions de carbonate d'ammoniaque, de sulfate de chaux, de chromate de potasse acétique. Ce sont les réactions du baryum. Le corps obtenu est donc du glycuronate de baryte, et l'osazone qui se forme de la glycurosazone[1].

Dans la solution alcoolique à 70°, il ne s'était pas formé de cristaux. Après évaporation de l'alcool au bain-marie et reprise par l'eau, cette solution, avec la naphtorésorcine, donne une réaction peu intense, mais nette, et reproduit l'osazone.

---

1. Grimbert et Bernier. *C. R. Soc. Biol.*, **67**, 467 (1909) et *Journ. Pharm. et Chim.* (6), **30**, 529 (1909).

CHAPITRE III

Acide glycuronique et glycurosazone.

A ces résultats, pourtant très nets, semblait-il, on pouvait objecter la difficulté d'obtenir une combinaison définie de l'acide glycuronique et de la phénylhydrazine. Les auteurs qui se sont occupés de cette question, en effet, ont publié les résultats les plus contradictoires, et presque tous ont conclu à l'impossibilité de préparer un produit constant et nettement caractérisé.

Néanmoins, encouragé par les recherches que j'ai décrites, j'ai cru utile de reprendre à nouveau la question; mais avant d'aborder ce sujet, je dirai quelques mots de la préparation de l'acide glycuronique et décrirai rapidement, parmi ses propriétés, celles que j'ai mises à profit dans mes recherches.

I. — Préparation de l'acide glycuronique.

Historique. — L'acide glycuronique a été découvert par Schmiedeberg et Meyer[1] dans l'hydrolyse de l'acide camphoglycuronique extrait de l'urine de chiens auxquels on avait fait ingérer du camphre. Von Mering[2] l'a ensuite caractérisé dans le dédoublement de l'acide urochloralique. Il a été en outre observé dans l'hydrolyse d'un grand nombre de composés d'origine animale.

D'après Spiegel[3], Külz[4] et Thierfelder[5], l'acide euxanthique est le composé qui le fournit le plus facilement et en plus grande abondance.

L'acide euxanthique se trouve à l'état de sel magnésien et calcaire dans le jaune indien naturel ou *purree*, sorte de masse à odeur urineuse, colorée en brun plus ou moins sale à l'extérieur, en

1. Schmiedeberg et Meyer. *Zeit. phys. Chem.*, 3, 422 (1879).
2. Von Mering. *Zeit. phys. Chem.*, 6, 489 (1882), et *Ber. chem. Ges.*, 15, 1019 (1882).
3. Spiegel. *Ber. chem. Ges.*, 15, 1964 (1882).
4. Külz. *Zeit. f. Biol.*, 23, 476.
5. Thierfelder. *Zeit. phys. Chem.*, 11, 388 (1887), et 13, 275 (1889).

jaune orange à l'intérieur. Ce jaune indien constitue le dépôt de l'urine des vaches qui mangent des feuilles de manguier.

On en extrait l'acide euxanthique qui s'y trouve dans la proportion d'environ 30 °/ₒ en suivant le procédé de GRAEBE[1].

Le jaune indien est épuisé par l'acide chlorhydrique dilué, et le résidu traité par une solution concentrée de carbonate d'ammoniaque qui dissout l'acide euxanthique. La liqueur filtrée, acidifiée par l'acide chlorhydrique, fournit l'acide euxanthique qui après recristallisation dans l'alcool se présente en aiguilles jaunes fondant à 156°-158° et insolubles dans l'eau.

Préparation. — L'acide euxanthique, hydrolysé par l'acide sulfurique à 2 °/ₒ, se dédouble en donnant de l'euxanthone et de l'acide glycuronique.

KÜLZ et THIERFELDER conseillent d'opérer l'hydrolyse à l'autoclave sans addition d'acide et en présence d'une grande quantité d'eau.

On chauffe à 120°-125°, pendant une heure, l'acide délayé dans 100 à 200 parties d'eau. Après refroidissement et filtration, on répète deux fois la même opération avec le résidu. On sépare par filtration le dépôt d'euxanthone et on réunit les liqueurs qui, par évaporation, fournissent des cristaux d'anhydride glycuronique. Par ébullition des eaux mères, on obtient à nouveau une certaine quantité d'anhydride. Cette lactone, en présence des alcalis, se transforme en glycuronate, d'où il est facile de régénérer l'acide.

II. — PROPRIÉTÉS DE L'ACIDE GLYCURONIQUE.

L'acide est soluble dans l'eau et l'alcool. Chauffé avec l'acide chlorhydrique, il donne du furfurol et reproduit les réactions qui ont été décrites et lui sont communes avec les pentoses, probablement à cause du peu de stabilité du groupe carboxyle (MANN et TOLLENS[2], GUNTHER, DE CHALMOT et TOLLENS[3]).

On le considère en effet comme un produit d'oxydation de glucose, $COOH-(CHOH)^4-CHO$, et les oxydants comme le brome le transforment en acide saccharique, $COOH-(CHOH)^4-COOH$.

1. GRAEBE. *Ann. Chem.*, 254, 274 (1889).
2. MANN et TOLLENS. *Ann. Chem.*, 290, 157 (1896).
3. GUNTHER, DE CHALMOT et TOLLENS. *Ber. chem. Ges.*, 23, 175 (1890), et 25, 2569 (1892).

Il possède beaucoup des réactions du glucose; comme lui et dans les mêmes proportions, il réduit la liqueur de Fehling; il agit de même sur l'oxyde de bismuth alcalin, le nitrate d'argent ammoniacal, l'indigo en solution alcaline. Il donne la réaction de Rubner[1] avec l'hydrate de plomb; il se combine avec le chlorure de benzoyle.

La levure de bière ne le fait pas fermenter; mais comme je l'ai remarqué, les moisissures cultivent très bien sur ses solutions et sur celles de glycuronate de baryte.

L'acide glycuronique et sa lactone donnent, en présence des alcalis, des carbonates alcalins et alcalino-terreux, des sels très stables, solubles dans l'eau pour la plupart et non décomposables par l'acide carbonique.

Ils ont un pouvoir rotatoire dextrogyre, mais peu intense et légèrement variable suivant les auteurs : $\alpha_D = +19°25$ en solution à 10 °/₀ à la température de 18° (5), d'après Thierfelder; +18°25, d'après Mann et Tollens; +19°4, d'après Külz, etc...

Les solutions d'acide glycuronique ne sont pas précipitées par le nitrate mercurique. Elles ne le sont pas davantage par l'acétate neutre de plomb, bien qu'on indique quelquefois le contraire. Le sous-acétate de plomb passe dans tous les traités classiques pour précipiter l'acide glycuronique. Cependant, une solution de ce corps, préparée à l'aide d'acide euxanthique et additionnée de sous-acétate de plomb, ne donne pas de précipité. Avec une solution de glycuronate de baryte, on observe un trouble par l'addition de quelques gouttes de sous-acétate, mais ce trouble disparaît aussitôt par un excès de réactif. Rien de plus naturel d'ailleurs, puisque le glycuronate de plomb est soluble. Le sous-acétate de plomb ammoniacal précipite entièrement l'acide glycuronique.

III. — Action de la phénylhydrazine sur l'acide glycuronique.

Les combinaisons formées par la phénylhydrazine et l'acide glycuronique ont donné lieu à de nombreux travaux, mais autant de mémoires, autant d'opinions différentes.

1. Rubner. *Zeit. f. Biol.*, 20, 397.

A. — Historique.

Thierfelder[1], en chauffant au bain-marie 1 partie de glycuronate de potasse, 2 parties de chlorhydrate de phénylhydrazine, 3 parties d'acétate de soude et 20 parties d'eau, a obtenu une combinaison en aiguilles jaunâtres, brunissant facilement et fondant à 114°-115°. Ce corps serait formé par l'union de 2,5 molécules de phénylhydrazine et d'une molécule d'acide glycuronique. Cette combinaison ne s'effectue facilement qu'avec un sel de l'acide glycuronique, et le traitement de la lactone n'a jamais donné à Thierfelder qu'une masse brunâtre, sans tendance à cristalliser.

Geyer[2] a regardé la combinaison hydrazinique comme de la glucosazone. Hirschl[3], au contraire, en fait une hydrazone fondant à 150°, non susceptible d'être confondue avec la glucosazone et n'entravant pas sa formation.

Giemsa[4], de son côté, a produit avec la lactone glycuronique des cristaux qui, après purification dans l'alcool absolu, se présentent sous forme d'aiguilles faiblement colorées en jaune, insolubles dans l'eau, presque insolubles dans l'alcool froid et l'éther, et fondant à 160°.

P. Mayer[5] a montré qu'on peut obtenir des produits différents en faisant varier les proportions de phénylhydrazine. Il a ainsi préparé trois corps, dont les points de fusion sont 105°-110°, 199°-205°, 159°-164°. Le produit qui fond vers 200° se rapproche sensiblement de la glucosazone, tandis que le suivant a un point de fusion voisin des pentosazones, mais il en diffère par sa teneur en azote. Un composé ayant pour point de fusion 190°-192°, a été obtenu par Naidus[6]. Plus récemment, Neuberg et Neimann[7], en appliquant le procédé de préparation de l'acrosazone de Wohl et Neuberg[8], ont cru pouvoir préparer la glycurosazone. Ils ont additionné une solution de 3 gr. 50 de lactone glycuronique dans 100 gr. d'eau, de 6 gr. 60 de phénylhydrazine et d'acide acétique

1. Thierfelder. *Zeit. phys. Chem.*, **11**, 388 (1887).
2. Geyer. *Wien. med. Wochens.*, **30**, 1685 (1889).
3. Hirschl. *Zeit. phys. Chem.*, **14**, 377 (1890), et *Ber. chem. Ges.*, **24**, 579 (1891).
4. Giemsa. *Ber. chem. Ges.*, **33**, 2296 (1900).
5. P. Mayer. *Zeit. phys. Chem.*, **29**, 59 (1900).
6. Naidus. *Inaug. Diss.* Pharmakol. Labor. de Kais. Militar. Mediz. Akad. in St-Petersburg (1903), 61, seit Russisch.
7. Neuberg et Neimann. *Zeit. phys. Chem.*, **44**, 97 (1905).
8. Wohl et Neuberg. *Ber. chem. Ges.*, **38**, 3108 (1905).

à 30 °/₀, et ont maintenu le mélange à l'étuve à 40°. Après quelques heures, il se sépare des cristaux jaune d'or qui vont en augmentant jusqu'à former, au troisième jour, une bouillie épaisse. Le produit, lavé à l'eau, recristallisé dans l'alcool à 50 °/₀, se présente sous forme d'aiguilles enchevêtrées, présentant les caractères de la glucosazone et fondant à 200°-202°.

La combinaison ne se fait bien que lorsque l'on fait agir, sur une molécule d'acide glycuronique, trois molécules d'hydrazine. Avec plus grande quantité, la combinaison s'opère encore, mais l'osazone formée diminue, car elle est un peu soluble dans la phénylhydrazine.

Enfin, d'après Hervieux[1], « la diagnose de l'acide glycuronique, fondée sur le seul examen microscopique de la combinaison avec la phénylhydrazine, ne repose sur rien de sérieux ».

B. — Recherches nouvelles.

Malgré tant de contradictions, et en raison des résultats que j'avais déjà obtenus d'autre part, j'ai pris le parti d'étudier à nouveau cette question en vérifiant les assertions précédentes, et au besoin en cherchant quelque procédé meilleur de combinaison.

J'ai préparé de l'acide glycuronique par hydrolyse de l'acide euxanthique et ai fait réagir l'acétate de phénylhydrazine sur cette solution.

1° *Directement.* — En cherchant à préparer directement avec cette solution la combinaison phénylhydrazinique de l'acide glycuronique, j'ai eu, en répétant les essais, des résultats peu concordants. Il se formait bien par refroidissement une faible proportion d'osazone, mais au microscope le précipité était tantôt constitué par des cristaux aux formes indécises et mêlés d'impuretés, tantôt par de petites sphères aux contours peu nets accompagnées de phénylhydrazine. Les points de fusion, déterminés après séchage dans le vide et lavage à la benzine, étaient inconstants et différaient les uns des autres par des écarts assez considérables. Tous les essais de recristallisation dans l'eau bouillante furent infructueux.

Ces résultats peu encourageants pouvaient cependant être attribuables à la manière d'opérer. La solution d'acide glycuronique devait renfermer des impuretés troublant les réactions, elle était

1. Hervieux. *Thèse* Doct. ès sciences, Paris (1908), 124.

colorée en jaune, probablement par la présence d'une faible quantité d'acide euxanthique, et HERVIEUX[1] a démontré que pour obtenir la combinaison parabromophénylhydrazinique, l'acide glycuronique devait être débarrassé, aussi soigneusement que possible, de toute substance étrangère qui entraverait la cristallisation et, qu'il est obligatoire, même avec les solutions d'acide glycuronique obtenues en partant du jaune indien, d'opérer la défécation à fond avec l'azotate mercurique. Il pouvait en être de même avec la phénylhydrazine.

2° *Après défécation au réactif nitromercurique.* — La solution d'acide glycuronique traitée par le réactif de PATEIN et DUFAU ne donne pas de précipité, et on serait tenté d'abandonner cette manière d'opérer. Cependant, si après avoir additionné la liqueur de réactif, on la neutralise par la soude, le précipité d'oxyde de mercure entraîne à ce moment les impuretés, car le liquide filtre limpide comme de l'eau et débarrassé de toutes ses matières colorantes.

J'ai donc, sur cette solution, repris l'action de la phénylhydrazine sans d'ailleurs en obtenir de meilleurs résultats. En variant les conditions d'expérience, les proportions de phénylhydrazine, etc..., je n'ai pu avoir de résultats constants. En opérant sur des solutions d'acide glycuronique présentant au polarimètre des déviations de $+0°8'$ à $+0°10'$, il se formait presque toujours à chaud au bain-marie des sortes de précipitations ne présentant au microscope aucun caractère cristallin ou affectant des formes de longues lames de coloration rouge brique.

Par refroidissement, il se produisait bien des cristallisations répondant à toutes les formes : branchages, étoiles, larges branches, houppes soyeuses, etc..., mais le tout était entremêlé de ces larges lames dont je viens de parler, et ces osazones, après lavage à la benzine, présentaient non point la coloration jaune caractéristique, mais une teinte rouge brique qui, à première vue, permettait de diagnostiquer un produit très impur. Les points de fusion variaient en effet dans des limites extraordinaires et il était impossible de tirer aucun caractère précis d'un pareil produit.

3° *Après précipitation à l'état de glycuronate de baryte.* — J'ai songé alors à appliquer aux solutions d'acide glycuronique le procédé qui m'avait bien réussi pour les liquides urinaires. Utilisant

1. HERVIEUX. *Thèse* Doct. ès sciences, Paris (1908), 126.

la même solution qui, après défécation au réactif nitromercurique, me donnait des résultats inconstants, je l'ai triturée avec de l'hydrate de baryte dans la proportion de 1/10, et après filtration, je l'ai additionnée de 2 volumes d'alcool; il s'est produit un précipité qui, recueilli et lavé à l'alcool, a été mis en suspension dans l'eau et traité par un courant d'acide carbonique.

Après décomposition du bicarbonate de baryte par ébullition, la solution filtrée, parfaitement incolore réduit la liqueur de Fehling, dévie à droite la lumière polarisée, donne d'une façon intense la réaction à la naphtorésorcine et présente tous les caractères des sels de baryum. Elle contient donc du glycuronate de baryte non décomposable par l'acide carbonique.

Cette solution traitée par de l'acétate de phénylhydrazine donne par refroidissement une osazone parfaitement cristallisée affectant des formes en oursins ou en branchages ne contenant pas d'impuretés et qui, après séchage dans le vide et lavage à la benzine, présente une belle coloration jaune et fond très nettement à 130°-132°. Elle présente toutes les propriétés décrites pour l'osazone retirée de l'urine.

Cette osazone est d'ailleurs obtenue très facilement en faisant la réaction directement sur le glycuronate de baryte, précipité par l'alcool.

Comment expliquer ces différences d'action de la phénylhydrazine?

Bien que la cause n'en soit pas encore parfaitement déterminée, elle me semble attribuable à la présence dans les solutions traitées soit directement, soit après défécation au réactif nitromercurique, de lactone glycuronique qui troublerait les réactions, alors que cette lactone est complètement décomposée par l'hydrate de baryte. Thierfelder, qui semble avoir obtenu jusqu'ici une osazone parfaitement cristallisée, avait déjà parlé de la nécessité d'opérer avec un sel de l'acide glycuronique et n'avait eu aucun résultat de ses essais sur la lactone.

Thierfelder avait donné comme point de fusion 114°-115°, mais à cette époque, la méthode de la fusion instantanée était à peine connue et il est très possible que ce produit corresponde à celui que j'ai obtenu et qui fond à 130°-132°.

J'ai cherché à m'en assurer et ai essayé de déterminer le point de fusion au tube capillaire, mais ce dernier varie suivant la rapidité de chauffage, et de plus, comme l'avait signalé Thier-

FELDER, le produit brunit très rapidement, et il est impossible de lui assigner un point de fusion précis.

4° *Influence des proportions de phénylhydrazine.* — Néanmoins, même avec le glycuronate de baryte, la formation de l'osazone ne se fait pas sans quelques précautions ; ainsi que j'ai pu m'en rendre compte, la proportion de phénylhydrazine a une influence considérable et les expériences suivantes suffiront à le prouver.

Une solution de glycuronate de baryte donnant au polarimètre une déviation de + 0°6′ a été traitée par l'acétate de phénylhydrazine. A 20 cm³ de solution, j'ai ajouté des proportions croissantes de solution d'acétate de soude à 25 °/₀, d'acide acétique et de phénylhydrazine, c'est-à-dire 1/4 de cm³, 1/2 cm³, 1 cm³, et 1 cm³5, et ai maintenu le tout trois quarts d'heure au bain-marie.

Dans les deux premiers tubes, il s'est déposé après refroidissement des masses jaunes amorphes avec beaucoup de phénylhydrazine, dans le troisième tube, il s'est formé des cristaux nets ; dans le quatrième, j'ai obtenu des cristallisations en rosaces plus abondantes que dans le précédent.

Ces deux dernières osazones séchées et lavées à la benzine ont fourni un produit de belle coloration jaune, fusible à 130°-132°.

Des résultats exactement semblables ont été obtenus avec une solution de glycuronate de baryte, présentant une déviation de + 0°10′.

Dans quatre tubes à essai, 20 cm³ ont été respectivement additionnés de 1/2 cm³, 1 cm³, 1 cm³5, et 2 cm³ de phénylhydrazine, etc.

Alors que les deux premiers tubes n'ont fourni que de rares cristaux mêlés d'impuretés, il s'est formé une belle osazone dans le troisième, dans le quatrième une osazone semblable, mais en quantité triple.

Il est donc nécessaire, pour obtenir facilement la glycurosazone, d'opérer en présence d'un excès assez considérable de phénylhydrazine. Cet excès doit d'ailleurs ne pas dépasser une certaine limite, car, ainsi que l'ont déjà remarqué NEUBERG et NEIMANN, l'osazone est légèrement soluble dans la phénylhydrazine.

Comme nous venons de le voir, il est donc possible d'obtenir une combinaison constante et bien déterminée de l'acide glycuronique et de la phénylhydrazine. Mais pour cela il est nécessaire d'opérer sur des sels de l'acide glycuronique et non sur l'acide lui-même, dont les solutions doivent toujours être accompagnées de lactone qui trouble les réactions.

CHAPITRE IV

L'acide glycuronique dans l'urine.

I. — Recherches antérieures sur la présence d'acide glycuronique dans l'urine.

A. — *Urines normales*. L'affirmation de la présence dans l'urine, d'acide glycuronique n'est d'ailleurs pas nouvelle. Sans pouvoir attribuer son origine à l'acide glycuronique, Chalmot, Gunther et Tollens[1] avaient remarqué la production de furfurol lorsqu'on distille avec de l'acide chlorhydrique le résidu d'évaporation de l'urine. Plus récemment Morel et Fraisse[2] ont fait la même constatation.

Flückiger[3] a attribué à la présence de conjugés glycuroniques la formation d'acétone qui se produit lorsqu'on distille avec de l'acide sulfurique et du bichromate de potasse l'urine préalablement concentrée.

P. Mayer[4] a signalé la possibilité de la présence d'acide glycuronique dans l'urine normale, et il a constaté que les urines hydrolysées par l'acide sulfurique donnaient la réaction à l'orcine et souvent une combinaison avec la phénylhydrazine.

L. Garnier et A. Gautier[5] admettent aussi à l'état normal la présence d'une faible quantité d'acide glycuronique dans l'urine. C'est également l'opinion de Mayer et Neuberg[6], ainsi que de C. Tollens et F. Stern[7], qui dans un mémoire récent estiment la proportion d'acide glycuronique à 0 gr. 30 par litre d'urine.

B. — *Urines pathologiques*. Si pendant longtemps on a douté

1. Chalmot, Gunther et Tollens. *Ber. chem. Ges.*, **25**, 2569 (1891).
2. Morel et Fraisse. *Bull. Soc. chim.* (4), **1**, 659 (1907).
3. Flückiger. *Zeit. phys. Chem.*, **9**, 353 (1885).
4. P. Mayer. *Berliner klin. Wochenschr.* (1899), 591 et 617.
5. A. Gautier. *Cours de chimie*, **3**, *Chimie biologique* (1898), 631.
6. Mayer et Neuberg. *Zeit. phys. Chem.*, **29**, 256 (1900).
7. C. Tollens et F. Stern. *Zeit. phys. Chem.*, **64**, 39 (1910)

de la présence de l'acide glycuronique à l'état normal dans l'urine, on l'a en revanche bien souvent caractérisé, sinon à l'état pathologique, du moins après l'absorption de très nombreux médicaments.

L'acide glycuronique est en effet susceptible de fournir avec beaucoup de corps des sortes de glucosides, et ces synthèses opérées par l'organisme servent à l'élimination d'un très grand nombre de composés dont la présence y est anormale.

Les conjugués dévient à gauche la lumière polarisée. Ils se dédoublent plus ou moins facilement par l'action des acides, de l'eau sous pression ou même par simple chauffage. Les uns possèdent des propriétés réductrices, d'autres en sont dépourvus. Certains d'entre eux seulement sont précipités par le sous-acétate de plomb, aucun ne semble entraîné par le nitrate mercurique.

On connaît mal le processus des combinaisons glycuroniques dans l'organisme ; on peut néanmoins admettre que les alcools se combinent directement à l'acide, les carbures étant transformés en alcools et les aldéydes subissant une réduction.

Ce serait sortir du cadre de ce travail que de décrire les nombreux conjugués glycuroniques qui ont été isolés jusqu'à ce jour. Leur étude a été faite par plusieurs auteurs, et ces recherches ont été réunies dans l'ouvrage d'Huppert [1].

II. — Caractérisation de l'acide glycuronique dans l'urine.

A. — *Urines riches en dérivés glycuroniques.* L'urine qui contient en proportion assez importante des conjugués glycuroniques présente un pouvoir rotatoire lévogyre qui ne disparaît pas par l'action du réactif de Patein et Dufau et après hydrolyse la déviation passe à droite.

Nicolas a appliqué à l'urine la réaction que j'ai déjà décrite et qui est fondée sur la formation de furfurol, suivie de la combinaison de ce composé avec l'indoxyle pour donner une indogénide. (Voir page 55).

Reale [2] a proposé la caractérisation de l'acide glycuronique à l'état de sel de cinchonine.

1. Huppert. *Analyse des Harns*, 10e édit. (1897), 197.
2. Enrico Reale. *Wiener, med. Wochensch.* (1901), 1578, 1624 et 1679.

Hervieux[1] et plusieurs autres ont utilisé la combinaison parabromophénylhydrazinique.

B. — *Urines pauvres en dérivés glycuroniques.* Tous ces moyens sont bons lorsque la quantité d'acide glycuronique en présence est quelque peu appréciable ; il n'en est plus de même avec l'urine normale, qui n'en contient qu'une très faible proportion. La combinaison parabromophénylhydrazinique ne se fait plus dans ces conditions.

Aussi Hervieux a-t-il proposé de concentrer l'acide glycuronique sous le plus faible volume possible.

1° Hydrolyser l'urine et la déféquer au nitrate acide de mercure, puis la concentrer en consistance de sirop très épais et ajouter de l'alcool. Les sels sont séparés par filtration et l'alcool évaporé. Le résidu contient l'acide glycuronique ;

2° Ou précipiter l'urine par le sous-acétate de plomb, décomposer le précipité par l'hydrogène sulfuré et concentrer la liqueur dans le vide.

A mon avis, il serait nécessaire non point d'employer l'acétate basique de plomb, mais l'acétate de plomb ammoniacal si on veut avoir une précipitation intégrale.

Toutes ces opérations sont longues et délicates.

C. — *Application à l'urine de la réaction à la naphtorésorcine.* C. Tollens[2] a appliqué à l'urine la réaction à la naphtorésorcine de B. Tollens[2] (voir page 59). Il fait directement la réaction avec l'urine, la solution de naphtorésorcine et l'acide chlorhydrique.

Reprenant ces expériences, j'ai, dans les mêmes conditions, obtenu une solution éthérée colorée en rouge violacé, à vive fluorescence, présentant la raie caractéristique avec une raie un peu à gauche. Une urine hydrolysée m'a donné sensiblement les mêmes résultats.

Il n'en existe pas moins dans cette manière d'opérer une cause d'erreur que semble avoir négligée Tollens et qui est cependant de nature à fausser très sensiblement les résultats.

Si, reprenant la même urine qui m'a servi à faire la réaction de Tollens, je la traite sans hydrolyse par volume égal d'acide chlorhydrique et que je l'agite ensuite avec de l'éther, la solution

---

1. Hervieux. *Thèse* Doct. ès sciences, Paris (1908), 126 et *C. R. Soc. Biol.*, **63**, 479 (1907).
2. C. Tollens. *Zeit. Phys. Chem.*, **56**, 115 (1908).

éthérée se colore en bleu grâce à l'indigotine qu'elle a dissoute et présente une raie voisine de celle observée précédemment. J'ai d'ailleurs opéré la même réaction à chaud dans le but de transformer l'indigotine en indirubine ; l'éther se colore cette fois en rouge foncé et donne toujours la même raie spectroscopique. Le résultat est identique en employant le chloroforme au lieu d'éther.

Il est donc de toute nécessité d'éliminer l'indoxyle si l'on veut utiliser la réaction de Tollens.

Il est impossible de se servir pour cela du nitrate acide de mercure à cause de l'action ultérieure de l'acide chlorhydrique sur l'azotate de soude.

J ai cherché à remplacer ce réactif par l'acétate de mercure en solution saturée et ai obtenu de bons résultats de ce procédé.

J'ai traité 50 cm^3 d'urine fraîche par 25 cm^3 d'une solution saturée d'acétate de mercure. Après neutralisation par la soude et élimination du mercure par la poudre de zinc, je me suis assuré que cette solution ne contenait pas d'indoxyle. J'ai ensuite pratiqué la réaction de Tollens sur ce liquide hydrolysé et non hydrolysé. J'ai dans les deux cas obtenu une coloration rouge violette, un peu plus accentuée de même que les bandes spectroscopiques après l'action des acides.

Cette même urine fournissait quelques cristaux d'osazone directement, et une abondante cristallisation après hydrolyse.

J'ai obtenu avec toutes les urines sur lesquelles j'ai pratiqué la réaction de Tollens une coloration rouge violette de l'éther dont l'intensité augmentait peu par hydrolyse préalable[1]. Rien de plus naturel d'ailleurs, puisque l'opération se fait en présence d'acide chlorhydrique au demi qui doit produire une hydrolyse partielle, sinon totale. La constance de cette réaction est une preuve de plus de la présence normale de l'acide glycuronique dans l'urine.

J'ai remarqué, en outre, que l'opération pouvait se faire sans élimination du mercure après défécation par l'acétate, ce qui permet de l'exécuter en quelques minutes.

Elle a, de plus, l'avantage de pouvoir être obtenue en présence

1. C. Tollens et F. Stern, dans un mémoire récent, *Zeit. phys. Chem.*, 64, 39 (1910), arrivent aux mêmes conclusions. Leur technique est cependant sujette à caution, car toutes leurs réactions ont été opérées sans élimination préalable de l'indoxyle.

de glucose alors que tous les autres procédés exigent l'élimination de cet élément par la fermentation qui n'est pas toujours sans inconvénient.

D. — *Formation de l'osazone*. Enfin, il sera toujours facile pour la recherche de l'acide glycuronique de pratiquer la formation de l'osazone après hydrolyse de l'urine, telle que je l'ai longuement décrite dans un précédent chapitre.

Je propose pour cela l'une des techniques suivantes :

1° Déféquer 50 cm³ d'urine avec 5 cm³ de réactif de Courtonne, filtrer et hydrolyser le liquide filtré avec 5 °/₀ d'acide chlorhydrique à l'ébullition au bain de sable pendant dix minutes ou avec 1 °/₀ d'acide sulfurique à l'autoclave à 120° pendant cinq minutes.

Neutraliser l'acide chlorhydrique après refroidissement par le carbonate de plomb (environ 4 gr. pour 1 cm³ d'acide) ou l'acide sulfurique à chaud par du carbonate de baryte, filtrer. Faire l'osazone dans les proportions suivantes :

Liquide hydrolysé	20 cm³
Solution d'acétate de soude à 25 °/₀.	1 —
Acide acétique cristallisable	1 —
Phénylhydrazine incolore	1 —

Mettre trois quarts d'heure au bain-marie bouillant et laisser le refroidissement s'opérer dans le bain-marie. Après douze à vingt-quatre heures, examiner les cristaux au microscope, recueillir le précipité sur un filtre, le laver à l'eau, le sécher dans le vide et le traiter par la benzine. Le point de fusion sera voisin de 150° et par recristallisation dans l'eau bouillante s'abaissera à 132°-135° environ.

Si on veut faire cette recristallisation, il est préférable de préparer l'osazone sur 40 ou 60 cm³ de liquide hydrolysé ;

2° Hydrolyser directement l'urine par l'acide sulfurique à 1 °/₀ à l'autoclave pendant cinq minutes. Neutraliser par la soude et ajouter à 50 cm³ de liquide, 25 cm³ de réactif de Patein et Dufau. (Il est préférable d'ajouter un léger excès de soude qui sera aussitôt neutralisé par l'acide du réactif que de laisser le milieu acide.) Compléter à 100 cm³. Filtrer, éliminer le mercure par agitation avec de la poudre de zinc et traiter le liquide filtré comme dans la réaction précédente ;

3° Si on tient à déféquer le liquide avant hydrolyse, on peut traiter 50 cm³ d'urine par 25 cm³ de solution d'acétate mercurique à saturation, filtrer, éliminer le mercure par le zinc et continuer comme précédemment.

Ces trois techniques donnent également de bons résultats et peuvent être indifféremment employées.

III. — Nature des combinaisons glycuroniques dans l'urine normale.

A quel état se trouve l'acide glycuronique dans l'urine normale ?

Ainsi que l'indique la formation d'une petite quantité d'osazone par l'action de la phénylhydrazine sur l'urine non hydrolysée, l'acide glycuronique semble exister en faible quantité sinon à l'état de sel, du moins à l'état de combinaison très facilement hydrolysable. J'ai étudié dans un chapitre précédent (voir page 40) diverses causes, acidité, durée et température de la réaction, action des diastases, etc., qui pouvaient provoquer le dédoublement de ce produit, je n'y reviendrai point.

Quelle est la nature du composé qui se laisse hydrolyser par les acides? Est-ce l'acide indoxylglycuronique dont Baumann[1], Schmiedeberg[2], Külz[3], Hervieux[4] ont signalé l'existence? S'il faut en croire Hervieux, « l'azotate mercurique ne dédouble nullement le chromogène indigurique intact, quelle que soit la sévérité de la défécation », et cependant la proportion d'osazone formée après traitement par ce réactif est sensiblement plus considérable. Là ne serait donc pas la seule origine de la formation d'acide glycuronique; d'ailleurs beaucoup d'urines ne contiennent pas de chromogène indigurique.

Mayer et Neuberg[5] considèrent l'acide glycuronique comme se trouvant à l'état de conjugué phénolique, indoxylique et scatoxylique. Daibler[6] et Reale[7] ont poursuivi l'étude de ces conjugués.

Toutes les recherches que j'ai entreprises dans le but de déterminer la nature exacte de ce composé n'ont pu me fournir aucune indication et j'en suis réduit à des hypothèses.

Neuberg et Neimann[8] en faisant réagir l'acide glycuronique sur l'urée en présence d'acide sulfurique ont obtenu un uréide, l'acide uréidoglycuronique, de formule $AzH^2 - CO - Az = CH -$

1. Baumann. *Zeit. phys. Chem.*, **1**, 67 (1877).
2. Schmiedeberg. *Archiv experim. Pathol. u. Pharm.*, **14**, 307 (1881).
3. Külz. *Zeit. f. Biol.*, **27**, 248 (1891).
4. Hervieux. *Thèse* Doct. ès sciences. Paris (1908), 98.
5. Mayer et Neuberg. *Zeit. phys. Chem.*, **29**, 256 (1900).
6. Daibler. *Chem. Centralb.*, **2**, 309 (1895).
7. Enrico Reale. *Wiener med. Wochenschr*, (1901), 1578, 1624 et 1679.
8. Neuberg et Neimann. *Zeit. phys. Chem.*, **44**, 97 (1905).

$(CHOH)^4$ — COOH, dont ils ont isolé le sel de baryum. Ce corps est lévogyre, dédoublable par les acides, non dédoublable par les ferments. Il n'est pas réducteur, mais le devient après ébullition prolongée.

Il n'y a rien d'impossible à ce que ce corps qui présente toutes les réactions des conjugués, existe en petite proportion dans l'urine. Je signale le fait sans qu'il m'ait été possible de le vérifier, et ce n'est là qu'une pure hypothèse.

IV. — L'acide glycuronique dans l'urine des animaux.

La présence de l'acide glycuronique ayant été parfaitement démontrée dans l'urine de certains animaux et en particulier des herbivores, il était logique d'essayer la formation d'osazone sur de telles urines.

De l'urine de vache a été traitée après neutralisation, car elle est très alcaline, par l'acétate neutre de plomb ou le nitrate acide de mercure, les essais d'osazone faits directement sur ce liquide ont été infructueux

Mais après hydrolyse suivie de défécation au réactif de Patein et Dufau, j'ai obtenu la formation d'une osazone, assez mal cristallisée, mais qui, reprise par l'eau bouillante, donnait par refroidissement des cristaux étoilés très nets. Ces cristaux recueillis, lavés, séchés dans le vide et traités par la benzine, fondaient à 137°-138°.

J'ai pratiqué les mêmes expériences avec des urines de chiens. Déféquées au réactif de Courtonne, ces urines fournissent directement une certaine proportion d'osazone très nettement cristallisée en larges cristaux groupés en rosaces.

L'osazone formée est plus abondante après l'action des acides.

CHAPITRE V

L'acide glycuronique dans l'organisme.

I. — Sang.

Le sang est doué vis-à-vis de la liqueur de Fehling de propriétés réductrices qu'on se contente généralement d'évaluer en glucose. Il est maintenant parfaitement démontré (Hanriot [1]) que le sérum sanguin contient du glucose, facile d'ailleurs à mettre en évidence par formation de glucosazone, ainsi que l'a fait le premier Pichardt [2]; mais le sérum renferme également d'autres substances réductrices et probablement d'autres hydrates de carbone.

Dès 1885 Otto [3] a signalé un corps réducteur qu'il n'a pu identifier, mais qu'il a dosé dans les sangs artériel et veineux du lapin, du chien, du cheval et de l'homme dans quelques cas pathologiques. Pichardt [4] a lui aussi affirmé la présence des substances réductrices autres que le glucose et Hedon [5] prétend avoir isolé un sucre pur donnant un dosage différent à la liqueur de Fehling et au polarimètre.

Signalons en passant la gomme animale découverte par Freund [6] et la jécorine étudiée par Valdemar Henriques [7] et par Bing [8] et niée par Pavy et Siau [9].

Ces derniers auteurs ayant obtenu une osazone fondant à 153° l'ont identifiée avec l'isomaltose de Baisch et Lemaire. Paul

1. Hanriot. *C. R. Soc. Biol.*, **50**, 543 (1898).
2. Pichardt. *Zeit. phys. Chem.*, **17**, 217 (1892-93).
3. Otto. *Pflügers Archiv* (1885), 35 et *Nord. medic. Archiv*, **16**, n° 27.
4. Pichardt. *Loc. cit.*
5. Hedon. *C. R. Soc. Biol.*, **50**, 510 (1898).
6. Freund. *Centralb. f. Physiol.* (1892), 345.
7. Valdemar Henriques. *Zeit. phys. Chem.*, **23**, 244 (1897).
8. H.-J. Bing. *Archiv f. Phys.*, **9**, 336.
9. Pavy et Siau. *Journal of physiology*, **26**, 282.

Mayer[1] a d'ailleurs combattu cette affirmation, le point de fusion ne lui paraissant pas caractéristique.

Enfin Lépine et Boulud[2] disent avoir caractérisé dans l'extrait de sang de chien nourri de viande :

1° De l'acide glycuronique sur lequel nous reviendrons;

2° Un sucre analogue au lévulose par la réaction de Selivanoff, la formation de lévulosate de calcium, et la déviation polarimétrique qui passe à droite après chauffage à 100° en présence d'acide chlorhydrique, le lévulose étant détruit dans ces conditions sans que le glucose soit attaqué:

3° Des pentoses caractérisables par les chiffres plus faibles obtenus par la fermentation et le polarimètre comparativement à la liqueur de Fehling, par les réactions à l'orcine et à la phloroglucine, par la formation avec le parabrophénylhydrazine d'une combinaison cristallisée n'ayant en solution pyridique qu'un faible pouvoir rotatoire dextrogyre et enfin par la production de furfurol;

4° Le maltose et non l'isomaltose, reconnaissable par son osazone soluble dans l'éther, fusible à 205° et après hydrolyse par l'augmentation du pouvoir réducteur et l'abaissement du pouvoir rotatoire. Grimbert[3] a d'ailleurs démontré que la maltosazone était parfaitement insoluble dans l'éther;

5° Un sucre analogue au saccharose, sans pouvoir réducteur déviant à droite et fermentescible.

J'aurais aimé connaître la technique suivie par ces auteurs pour séparer dans l'extrait de sang des substances qui s'y rencontrent en quantité relativement très faible et jouissent de propriétés très voisines et souvent inverses les unes des autres.

Par la suite Lépine et Boulud[4] ont restreint leurs recherches à l'acide glycuronique et ont étudié ce composé dans de nombreuses publications.

Confirmant les recherches de Paul Mayer[5] sur la présence d'acide glycuronique dans le sang de l'homme et du bœuf, ils l'ont de nouveau caractérisé dans le sang de chien et de cheval par sa

---

1. P. Mayer. *Zeit. phys. Chem.*, **32**, 518 (1901).
2. Lépine et Boulud. *C. R. Ac. des sciences*, **133**, 138 (1901).
3. Grimbert. *Journ. Pharm. et Chim.* (6), **17**, 225 (1903).
4. Lépine et Boulud. *C. R. Ac. des sciences*, **133**, 720 (1901); **134**, 139 (1902) et *Journ. phys. et pathol. gén.* (1905), 775 et (1906), 581.
5. Paul Mayer. *Zeit. phys. Chem.*, **32**, 518 (1901).

combinaison parabrophénylhydrazinique et les propriétés optiques des solutions avant et après hydrolyse. Ils concluent, d'ailleurs, à la formation *in vitro* d'acide glycuronique conjugué.

D'après Lépine et Boulud[1], l'acide glycuronique paraît n'exister que dans les globules et non dans le plasma. Sa formation *in vitro* est sous la dépendance des globules blancs et il serait produit aux dépens, non du glucose, mais du sucre *virtuel* du sang. Néanmoins, sa recherche est délicate, car sa formation est corrélative de sa destruction par une glycolyse qui paraît s'exercer d'une façon très intense sur certaines conjugaisons. L'une ou l'autre des deux actions l'emporte, suivant les conditions. Le sang veineux paraîtrait en renfermer moins que le sang artériel.

C'est après hydrolyse que doit se faire la recherche de l'acide glycuronique, mais ce corps étant en partie détruit par l'acide chlorhydrique, Lépine et Boulud[2] conseillent d'employer comme hydrolysant volume égal d'une solution concentrée d'acide tartrique, en opérant en tube scellé à 120°.

Les recherches de ces auteurs ont été mises en doute par Morel et Fraisse[3], qui n'ont pu obtenir aucune réaction de l'acide glycuronique dans le sang de chien.

D'ailleurs, dans ces dernières années, Lépine et Boulud[4] eux-mêmes attribuent l'augmentation du pouvoir réducteur du sang après hydrolyse, non seulement à l'acide glycuronique qui s'y rencontre « en trop faible proportion pour que cette explication soit suffisante », mais encore « à la mise en liberté de glucose qui se trouve à l'état de sucre *virtuel* ».

Ce sucre virtuel serait une sorte de glucoside, dédoublable en partie par l'invertine et entièrement par l'acide fluorhydrique, selon le procédé d'Hugounenq et Morel[5]. Lépine et Boulud tirent un argument en faveur de leur thèse de ce que le sucre du sérum normal ne dialyse pas dans certaines conditions. Ils voient en même temps dans ce fait l'explication de l'absence de glucose dans l'urine, alors que cet élément existe dans le sang en quantité

1. Lépine et Boulud. *C. R. Ac. des Sciences*, **136**, 1037 (1903); **138**, 610 (1904); **142**, 197 (1906); **148**, 453 (1909).
2. Lépine et Boulud. *C. R. Ac. des Sciences*, **136**. 1037 (1903), et *Bull. Soc. chim.* (3) **29**, 183 (1903).
3. Morel et Fraisse. *Bull. Soc. chim.* (4) **1**, 659 et 1043 (1907).
4. Lépine et Boulud. *C. R. Ac. des Sciences*, **143**, 500 et 539 (1906); **147**, 226 (1908).
5. Hugounenq et Morel. *C. R. Ac. des Sciences*, **146**, 1293 (1908).

appréciable. Mais il y forme probablement avec les matières albuminoïdes une combinaison plus ou moins lâche qui ne permet pas sa dialyse.

Appliquant au sang les recherches que j'ai faites sur l'acide glycuronique dans l'urine, j'ai cherché à obtenir la combinaison phénylhydrazinique dans le sérum.

50 cm³ de sang humain ont été abandonnés à la glacière et le sérum décanté après coagulation parfaite. Ce sérum, additionné du réactif de Patein, a été, après élimination de mercure, traité par de la levure de bière à la température de 20° environ, puis par l'acétate de phénylhydrazine dans les conditions ordinaires.

L'osazone obtenue a été dissoute dans l'acétone au demi et, après évaporation du dissolvant, recueillie sur un filtre, séchée dans le vide et traitée par la benzine. Elle présente alors un point de fusion peu net, de 160° environ, correspondant sensiblement à l'osazone de Pavy et de Siau, qu'ils considèrent comme de l'isomaltosazone, et à celle de Paul Mayer, qui y voit une combinaison d'acide glycuronique et de phénylhydrazine.

Cependant, cette osazone, traitée par l'eau bouillante, s'y dissout en partie et laisse un faible résidu, présentant un point de fusion de 213°-215° qui correspond certainement à de la glucosazone encore impure : en effet, après un nouveau traitement à l'eau bouillante, le point de fusion continue à s'élever.

Dans la solution, il se forme par refroidissement des cristaux étoilés très nets, fondant au bloc Maquenne à 132°-135°, et pouvant être considérés comme de la glycurosazone.

Les composés isolés par les auteurs précédents semblent donc être des mélanges.

Une fois de plus l'acide glycuronique a été caractérisé dans le sang, et paraît en être un élément normal.

II. Muscles et organes.

D'après Arthus[1], le muscle vivant et reposé ne contient que peu de sucre, mais le muscle séparé du corps renferme un principe réducteur fermentescible et dextrogyre qui est très vraisemblablement du glucose. Panormoff[2] a obtenu en effet de la glucosa-

1. Arthus. *Précis de chimie phys.* (1908), 229.
2. Panormoff. *Zeit. phys. Chem.*, **17**, 596 (1892-93).

zone et une osazone fondant à 153°, et Pavy et Siau[1] ont confirmé ces recherches.

Cadéac et Maignon[2] ont constaté la glycosurie d'origine musculaire et l'apparition des composés glycuroniques et du glucose dans les urines des animaux soumis à la ligature et à l'écrasement des muscles. Ils ont, en outre, étudié la production de sucre dans les muscles lisses et striés, ainsi qu'après la mort.

Turpaud[3], en mettant en pratique la recherche de l'acide glycuronique à l'aide de la phénylhydrazine telle que je l'ai indiquée pour l'urine, a réussi à obtenir une osazone dans la macération de viande de bœuf. Ce produit, repris par l'eau bouillante, donne un résidu de glucosazone fusible à 230°, et la solution laisse cristalliser de la glycurosazone fondant très nettement à 132°.

Fraisse[4] a étudié la teneur en pentoses et en acide glycuronique des organes des animaux domestiques.

Il s'est basé pour cela sur la production de furfurol par l'acide chlorhydrique et en attribue la formation à l'arabinose, au xylose et à l'acide glycuronique libre et combiné.

Ces éléments se trouvent dans presque tous les organes qui peuvent être ainsi classés par ordre décroissant : pancréas, rate, foie, testicules, mamelles, cerveau, muscles, sang. La proportion semble d'ailleurs varier suivant les espèces.

La plus grande quantité se trouve chez le porc, pour diminuer ensuite chez le mouton, le bœuf, le cheval, la chèvre, le veau. Ces éléments semblent plus abondants chez les animaux âgés que chez les jeunes.

Lépine et Boulud[5] ont également signalé, après la mort, la présence d'acide glycuronique dans le foie, où il coexisterait parfois avec du maltose. Enfin, Embden[6], donne le foie comme lieu de synthèse de l'acide glycuronique.

---

1. Pavy et Siau. *Journal of physiology*, **24**, 479.
2. Cadéac et Maignon. *C. R. Ac. des Sciences*, **134**, 1000 et 1443 (1902); **136**, 120, (1903).
3. Turpaud. *Thèse* Doct. pharm., Paris (1910).
4. Fraisse. *Thèse* Doct. pharm., Lyon (1906-1907).
5. Lépine et Boulud. *C. R. Ac. des Sciences*, **134**, 139 (1902), et *C. R. Soc. Biol.*, **53**, 1041 et 1061 (1901).
6. Embden. *Beitr. chem. Phys. u. Pathol.*, **2**, 591-592.

III. Bile et fèces.

Bial[1] a décelé à l'aide de son réactif l'acide glycuronique en plus ou moins grande quantité dans la bile des chiens. Il y a caractérisé en outre des conjugaisons glycuroniques après absorption de menthol[2].

Bonnanni[3] a obtenu les mêmes résultats.

Leersum[4], après avoir concentré au bain-marie de la bile additionnée d'acide sulfurique et l'avoir traitée par un mélange d'alcool et d'éther, a obtenu par évaporation de ces dissolvants une substance donnant les réactions de l'acide glycuronique conjugué qu'il regarde comme un élément normal de la bile. C'est même à cet acide glycuronique qu'il attribue le pouvoir réducteur de beaucoup d'urines ictériques.

Dans le but de vérifier ces indications, de la bile de porc a été recueillie et diluée dans trois fois son volume d'eau, puis additionnée de réactif de Courtonne dans la proportion de 10 °/₀. Il se forme un volumineux précipité qui entraîne tous les pigments. Le liquide qui filtre concentré dans le vide donne d'une façon très intense la réaction de Tollens à la naphtorésorcine. On peut donc conclure à la présence d'acide glycuronique dans la bile.

Bial[5] s'est également occupé de la question de la recherche de l'acide glycuronique dans les matières fécales. En épuisant des fèces additionnées d'acide sulfurique par un mélange éthéro-alcoolique, qui, d'après Külz[6], dissout seulement les conjugués glycuroniques, il a pu dans le résidu les y caractériser par son réactif.

Les combinaisons glycuroniques semblent apportées dans l'intestin par la bile. Des essais directs sur des excréments humains ont montré à Bial[7] que les acides glycuroniques étaient dédoublés au contact des fèces et que l'acide libéré se trouvait rapidement détruit. L'urine ne serait donc pas la seule voie d'élimination des conjugués glycuroniques.

1. Bial. *Verhandl. d.* 20 *Kongr. f. innere Med.* (1902), 515.
2. Bial. *Zeit. phys. Chem.*, **45**, 258 (1905).
3. Bonnanni. *Bollettino della R. Academia medica di Roma*, **32**.
4. E. C. van Leersum. *Beitr. chem. Phys. u. Pathol.*, **3**, 522 et 574 (1903).
5. Bial. *Beitr. chem. Phys. u. Pathol.*, **2**, 528, et *D. med. Wochensch.* (1902), n° 15.
6. Külz. *Zeit. f. Biol.*, **27**, 248.
7. Bial. *Zeit. phys. Chem.*, **45**, 258 (1905).

IV. — Liquide céphalo-rachidien.

La question du pouvoir réducteur du liquide céphalo-rachidien a suscité de nombreux travaux. On l'a tour à tour attribué à la pyrocatéchine (Halliburton[1]), à l'alcaptone (Gorup-Besanez[2]), au galactose (Langstein[3]), à un produit volatil (Guerbet[4]) et enfin au glucose. La présence du glucose est encore niée par quelques auteurs (Thompson et Hill[5], Mathieu[6], Halliburton, Hammarsten), malgré les expériences concluantes de Nawratzki[7], Grimbert et Coulaud[8], Bierry et Lalou[9], Widal et Sicard[10], Rossi[11], Lannois et Boulud[12], Gillard[13], Patein[14], Mestrezat[15], etc.

Ce dernier auteur ayant pu se procurer un liquide d'hydrocéphalie présentant la composition du liquide céphalo-rachidien normal y a décelé un principe réducteur différent du glucose sans pouvoir affirmer si ce corps se rencontrait de façon constante ou se formait seulement par glycolyse. Bien qu'il n'ait pu identifier cette substance, Mestrezat a émis l'opinion qu'on pouvait se trouver en présence d'acide glycuronique ou d'un dérivé de cet acide.

Cette opinion m'a paru très vraisemblable et j'ai cherché à la vérifier en mettant en pratique les procédés que j'ai décrits.

Dès l'abord la recherche de l'acide glycuronique dans le liquide céphalo-rachidien se présentait comme très délicate; en effet, la proportion de ce composé, si l'on en juge par la teneur en glucose, devait être fort restreinte, et l'on ne dispose en outre généralement pour de telles recherches que d'une très faible quantité de liquide.

---

1. Halliburton. *Lehrbuch d. chem. Phys. u. Pathol.*, 355.
2. Gorup-Besanez. *Traité de Chim. phys.*, Paris (1880), traduct. française.
3. Langstein. *Jahrb. f. Kinderheilk*, **58** (1903).
4. Guerbet. *Journ. Pharm. et Chim.* (6), **10**, 59 (1899).
5. Tromson et Hill. *Phys. et pathol. de la circulation cérébrale*, Londres (1896).
6. Mathieu. *Thèse* de Lyon (1908).
7. Nawratzki. *Zeit. phys. Chem.*, **33** (1897).
8. Grimbert et Coulaud. *C. R. Acad. des Sciences*, **136**, 391 (1903).
9. Bierry et Lalou. *C. R. Soc. Biol.*, **56**, 253 (1904).
10. Widal et Sicard. *Soc. méd. Hôp.* (1904).
11. Rossi. *Zeit. phys. Chem.*, **39**, 183 (1903).
12. Lannois et Boulud. *Lyon méd.* (1904), 1051.
13. Gillard. *Thèse* de Lyon (1904).
14. Patein. *Journ. Pharm. et Chim.* (6), **23**, 239 (1906).
15. Mestrezat. *Journ. Pharm. et Chim.* (6) **29**, 472 (1909).

J'ai tout d'abord essayé la formation de l'osazone sur le liquide préalablement hydrolysé et ai obtenu après défécation au nitrate acide de mercure un produit fondant à 213°. Cette osazone, reprise par une petite quantité d'eau au bain-marie bouillant, ne s'y est dissoute que dans une très faible proportion; mais après nouvelle dessiccation dans le vide le résidu fondait à 227°, point voisin de celui de la glucosazone. Il avait donc abandonné au liquide le produit qui abaissait précédemment son point de fusion. Néanmoins, la solution n'a laissé déposer par refroidissement que de petits globes mal cristallisés et en quantité tout à fait insuffisante pour être recueillis et étudiés. Ces recherches avaient été d'ailleurs faites sur 25 cm³ de liquide céphalo-rachidien.

Dans une autre opération pratiquée sur 21 cm³ de liquide de ponction lombaire, j'ai essayé la réaction à la naphtorésorcine. Après hydrolyse par l'acide sulfurique à l'autoclave et neutralisation, la réaction opérée sur 2 cm³ de liquide a été négative. Le reste du liquide évaporé dans le vide à 6 cm³ et traité suivant la technique de Tollens a donné une coloration brunâtre de l'éther présentant, il est vrai, quelques reflets violacés. Ainsi que j'ai pu m'en assurer comparativement avec une solution de glucose, la coloration brunâtre est due à la présence de ce sucre et, quoique peu intense, est suffisante pour masquer en partie la coloration violette de l'acide glycuronique.

J'ai cherché à éviter cette cause d'erreur en détruisant préalablement le glucose par la fermentation.

Dans ce but, du liquide céphalorachidien humain recueilli aseptiquement, car ce liquide est très facilement envahi par les microbes, a été additionné de levure de bière et abandonné deux jours à la température de 20° environ. Le liquide centrifugé a été hydrolysé par l'acide sulfurique et neutralisé par le carbonate de baryte. 5 cm³ donnent avec la naphtorésorcine une coloration violette peu intense mais très nette, la coloration due au glucose ne se produisant pas.

J'ai obtenu les mêmes résultats après fermentation avec le liquide céphalo-rachidien de veau et de mouton. Je m'étais préalablement assuré de la présence du glucose qui y existe comme dans le liquide humain.

Il m'a semblé intéressant de mettre en évidence les propriétés réductrices de l'acide glycuronique, et de chercher à apprécier la quantité qui peut se rencontrer dans le liquide céphalo-rachidien.

Ne pouvant me procurer du liquide humain en quantité suffisante, je me suis adressé pour ces recherches à des liquides de veaux ponctionnés à l'abattoir.

Ces liquides recueillis dans des tubes stérilisés ont été portés immédiatement à 100° pour détruire le ferment glycolytique qui était susceptible de s'y rencontrer et pouvait former *in vitro* de l'acide glycuronique aux dépens du glucose.

J'ai ensuite pratiqué les opérations suivantes :

1° 22 cm^3 de liquide ont été déféqués au réactif de Patein et Dufau et amenés à 30 cm^3. Après filtration et élimination du mercure par le zinc, j'ai recueilli 20 cm^3 qui ont été en partie évaporés dans le vide. Sur le résidu j'ai pratiqué le dosage par reste à la liqueur de Fehling, tel que je l'ai indiqué page 47, et j'ai obtenu un chiffre de glucose correspondant, toutes corrections de volumes étant faites, à 0 gr. 253 de glucose par litre.

2° 140 cm^3 de liquide ont été additionnés de levure de bière, abandonnés à la fermentation pendant quarante-huit heures et divisés en deux parties égales, soit 70 cm^3 cubes.

a) La première partie a été déféquée au nitrate mercurique et amenée à 100 cm^3, pour recueillir finalement 75 cm^3 de liquide.

Après concentration dans le vide, j'ai essayé le titrage par la méthode précédente et j'ai constaté l'absence de pouvoir réducteur et par conséquent de glucose, entièrement disparu par la fermentation.

b) La seconde partie a été hydrolysée à l'autoclave avec 1 °/₀ d'acide sulfurique, neutralisée à la soude et traitée comme en *a*.

Concentrée dans le vide et dosée par reste, son pouvoir réducteur en glucose, et toutes corrections faites, correspond à 0,14 par litre.

Ces chiffres confirment donc les résultats précédents : réaction à la naphtorésorcine, abaissement du point de fusion de l'osazone après hydrolyse, et permettent de conclure à la présence dans le liquide céphalo-rachidien de composés glycuroniques.

V. — Lait.

Le lait renferme en assez grande abondance un sucre qu'on a facilement extrait à l'état cristallisé. Néanmoins, Esbach [1] a pré-

1. Esbach. — *Journ. des Connais. méd. prat.*, 49e année (1881), et *Journ. Pharm. et Chim.* (5), **17**, 533 (1888).

tendu que le lait ne contient pas un seul et unique sucre, mais qu'il y a dans chaque lait un mélange de lactoses à propriétés très différentes suivant les espèces animales considérées. Béchamp[1] a également conclu que le sucre de lait présentait des propriétés spéciales dans le lait de femme, mais Denigès[2] a démontré « la parfaite identité des sucres retirés par cristallisation des laits de femme, ânesse, jument, vache, chèvre, brebis », cette identité ne se produisant pas par cristallisation de ces sucres, mais se retrouvant dans les laits eux-mêmes.

A côté du lactose se rencontre un autre hydrate de carbone, peu abondant, encore mal connu et regardé comme de la gomme animale (Ritthausen[3], Schrmöger[4], Landwehr[5]). C'est cette substance qui doit causer les anomalies constatées dans certains laits par les dosages au polarimètre et à la liqueur de Fehling. Denigès, en effet, a très nettement démontré l'existence de substances non signalées jusqu'ici, très solubles dans l'eau, non précipitables par les réactifs des albuminoïdes, sans pouvoir réducteur, mais actives sur la lumière polarisée, et ne paraissant pas de nature azotée.

Leur pouvoir rotatoire est dextrogyre dans les laits d'ânesse et de jument, il est lévogyre dans le lait de femme.

Quelle est la nature de ces substances? Comme suite aux recherches précédentes, j'ai songé à des conjugaisons glycuroniques.

Cette hypothèse, d'ailleurs peu probable, était difficile à vérifier par la formation d'osazone, la lactosazone et la glycurosazone possédant des solubilités identiques et me semblant impossibles à séparer.

J'ai donc eu recours pour ces recherches à la réaction de Tollens à la naphtorésorcine.

Des essais préliminaires, effectués avec le lait de vache et ayant surtout pour but l'établissement d'une technique, ont été négatifs. Ce lait ne contient d'ailleurs pas de substance à propriétés optiques spéciales.

J'ai repris mes expériences avec du lait de femme dont 100 cm^3 ont été traités par 100 cm^3 d'alcool à 95° et filtrés. Ce filtrat a été

1. Béchamp. *Conférences de la Soc. chim. de Paris* (1889-1892).
2. Denigès. *Contribution à l'étude des lactoses*, Paris (1892).
3. Ritthausen. *Journ. f. prāk. Chem.* (2), **15**, 329 (1877).
4. Schrmoger. *Central. f. Agric. ch.* (1885), 130.
5. Landwehr. *Ber. chem. Ges.*, **19**, 258 (1886).

évaporé dans le vide à 40 cm³ et déféqué avec une solution d'acétate mercurique à saturation. Après filtration, la réaction de Tollens essayée sur 5 cm³ a été absolument négative. Le reste des liqueurs a été évaporé à 20 cm³ et abandonné à cristallisation. Un nouvel essai sur les eaux-mères a été de nouveau négatif.

Enfin, après évaporation à siccité, le résidu a été repris par l'alcool, qui dissout fort peu le lactose. La solution alcoolique a été évaporée, le résidu dissous dans l'eau n'a de nouveau donné aucune coloration de l'éther dans la réaction à la naphtorésorcine.

Au cours de ces expériences, c'est à dessein que je n'ai point pratiqué l'hydrolyse à cause de la présence de lactose; mais, dans la réaction de Tollens, l'acide chlorhydrique à l'ébullition devait être suffisant pour produire le dédoublement.

Le lait de femme et le lait de vache ne paraissent donc pas renfermer de composés glycuroniques.

VI. — Liquides pathologiques.

Le nombre des liquides pathologiques que j'ai eu l'occasion d'examiner est restreint. Mes recherches ont porté sur deux liquides d'ascite, un liquide pleural et un liquide de kyste dermoïde de l'ovaire.

Les deux liquides d'ascite que j'ai pu me procurer donnaient, hydrolysés ou non, une osazone fondant vers 227-228°, paraissant par conséquent formée de glucosazone presque pure.

Néanmoins, l'un d'eux, conservé quelques semaines à l'aide d'essence de moutarde, a pu me donner, après élimination des albumines et concentration, une très légère coloration avec la naphtorésorcine. Les conditions d'expériences ont été cependant trop défavorables pour tirer de ce fait une conclusion ferme.

Le liquide pleural a donné une osazone en très faible quantité et présentant des cristallisations différentes : formes capillaires, branches de genêts, aspect de mousse. Elle ne semble pas constituée par un seul corps. Son point de fusion a été en effet trouvé à 205°-206° et laisse supposer la présence d'une osazone fondant à une température bien inférieure, la glucosazone ayant été nettement caractérisée par sa forme en branches de genêts.

J'ai pu me procurer vers la fin de ce travail un liquide de kyste dermoïde de l'ovaire. Possédant alors une technique mieux éta-

blie, j'ai dirigé mes expériences de la façon suivante que je conseille d'appliquer à tous les cas analogues :

50 cm³ de liquide ont été traités par trois volumes d'alcool à 95° et le précipité qui s'est formé séparé par filtration. Après concentration dans le vide à 100 cm³, le liquide devenu trouble a été additionné d'une solution d'acétate de mercure à saturation, filtré et concentré de nouveau dans le vide à 20 cm³ environ.

Sur 5 cm³ de ce liquide, la réaction à la naphtorésorcine a été nettement positive, mais peu intense.

Sur 15 cm³ un essai à la phénylhydrazine m'a donné une faible quantité d'osazone fondant vers 205° et qui, après reprise à l'eau bouillante, laissait un résidu ayant un point de fusion de 230°.

Autant qu'il est permis de tirer des conclusions d'expériences aussi succinctes, l'acide glycuronique semblerait exister à côté du glucose, mais seulement à l'état de traces dans les liquides pathologiques.

CHAPITRE VI

Dosage de l'acide glycuronique.

Le dosage de l'acide glycuronique libre et surtout conjugué ne donne encore, à l'heure actuelle, que des résultats très approximatifs. Aussi passerons-nous très rapidement en revue les méthodes proposées.

I. — Dosage par formation de furfurol.

1° Gunther, de Chalmot et Tollens[1] ont basé une méthode de dosage de l'acide glycuronique sur sa décomposition à chaud par l'acide chlorhydrique avec dégagement d'une molécule de furfurol et d'une molécule d'anhydride carbonique.

La solution qui a distillé contient le furfurol, elle est neutralisée et additionnée d'acide acétique.

On y dose le furfurol :

1° Par titrage à l'aide d'une solution d'acétate de phénylhydrazine ajoutée jusqu'à ce que le mélange ne réagisse plus sur l'acétate d'aniline et titrée de la même manière sur une solution connue de furfurol;

2° Par précipitation à l'état de furfurol phénylhydrazone qu'on sèche à 60°-70° et qu'on pèse. Flint et Tollens[2] conseillent la précipitation dans l'eau salée, où l'hydrazone est moins soluble;

3° Par précipitation à l'état de furfuramide (Stone[3]);

4° Par précipitation à l'état de furfurol phloroglucide qui se forme en traitant le distillat par de l'acide chlorhydrique en excès et de la phloroglucine dans la proportion de deux à trois parties pour une de furfurol (Welbel et Zeisel[4], Councler[5]);

1. Gunther, de Chalmot et Tollens. — *Ber. chem. Ges.*, **23**, 1751 (1890); **24**, 694 et 3575 (1891); **25**, 2569 (1892).
2. Flint et Tollens. *Ber. chem. Ges.*, **25**, 2912 (1892).
3. Stone, *Ber. chem. Ges.*, **23**, 3791 (1890).
4. Welbel et Zeisel. *Monatshefte f. Chemie*, **16**, 283.
5. Councler. *Chemiker Zeitung*, **21**, 2 (1897).

5° Par la méthode colorimétrique en comparant la teinte obtenue lorsqu'on additionne d'acétate d'aniline le liquide distillé avec une liqueur étalon contenant 0 gr. 01 de furfurol par litre et traitée de la même manière.

On peut encore, au lieu du furfurol, doser l'acide carbonique qui se dégage en même temps que lui en le recueillant dans un appareil à soude.

D'après Lefèvre et Tollens[1], la réaction n'est pas intégrale.

C. Tollens[2] prétend que la méthode, telle qu'il l'a décrite avec ses élèves, donne des résultats approchés, même avec les acides euxanthique et urochloralique. Cette méthode lui a servi à doser l'acide glycuronique dans les urines normales et pathologiques[3].

Elle n'est pas appplicable à un mélange contenant des pentoses, des pentosanes ou des nucléoprotéides.

II. — Dosage a l'état de combinaison parabromophénylhydrazinique.

Les conjugués glycuroniques sont chauffés à l'autoclave avec des acides minéraux dilués, et l'on opère la combinaison parabromophénylhydrazinique dans les conditions que j'ai décrites (p. 57).

III. — Dosage a l'état de saccharate d'argent.

Neuberg et Neimann[4] reprochent aux dosages précédents d'être toujours accompagnés d'une décomposition partielle de l'acide avec mise en liberté de furfurol. Aussi, dans le but d'éviter ces pertes, ils proposent d'hydrolyser les conjugués glycuroniques en tube scellé par l'acide bromhydrique, à 1-3 %, et en présence de brome qui transforme l'acide formé en acide saccharique, qu'on précipite à l'état de sel de baryte basique, et qu'on transforme ensuite en sel bi-argentique qui peut être recueilli.

Malheureusement, cette méthode, bonne avec l'acide phénolglycuronique, l'est déjà moins avec l'acide mentholglycuronique et échoue complètement avec les acides euxanthique et urochlo-

1. Lefèvre et Tollens. *Ber. chem. Ges.*, **40**, 4513 (1907).
2. C. Tollens. *Zeit. phys. Chem.*, **61**, 95 (1909).
3. C. Tollens et F. Stern. *Zeit. phys. Chem.*, **64**. 39 (1910).
4. Neuberg et Neimann. *Zeit. phys. Chem.*, **44**, 127 (1905).

ralique; elle permet néanmoins le dosage de l'acide glycuronique dans certains cas, en présence des pentoses et des nucléoprotéides.

IV. — Dosage colorimétrique.

Tout récemment, C. Tollens[1] a appliqué au dosage colorimétrique de l'acide glycuronique la réaction proposée pour sa recherche à l'aide de la naphtorésorcine.

V. — Dosage en présence de glucose.

Lépine et Boulud[2], dans leurs études de l'extrait de sang, déterminent le pouvoir réducteur de la liqueur en glucose et la déviation polarimétrique. Connaissant le pouvoir rotatoire de l'acide glycuronique et du glucose, et sachant que leur pouvoir réducteur est le même, on peut calculer les proportions de ces deux corps.

1. C. Tollens. *Zeit. phys. Chem.*, 61, 95 (1909).
2. Lépine et Boulud. *Loc. cit.*

CHAPIRE VII

Origine physiologique de l'acide glycuronique.

L'acide glycuronique dérive, pour la plus grande partie, des hydrates de carbone de l'alimentation, ainsi que du glycogène animal (Tollens[1]). Néanmoins, même en privant les animaux de glycogène par le jeûne, il est encore possible de démontrer chez eux la présence d'acide glycuronique (Thierfelder[2]). Aussi Von Mering[3] et Nebelthau[4] voient-ils l'origine de ce corps dans le dédoublement de l'albumine, tout en reconnaissant qu'il est bien difficile de débarrasser totalement un organisme de glycogène.

Schmiedeberg et Meyer[5] regardent l'acide glycuronique comme un produit d'oxydation du glucose, et c'est également l'opinion de P. Mayer[6].

Il est vraisemblable qu'au sein de l'organisme, le groupe aldéhydique du glucose est rendu stable par sa combinaison avec des substances étrangères et se trouve préservé de l'oxydation, tandis que la fonction alcool primaire est oxydée en donnant une fonction acide (Fischer et Piloty[7]). La perte d'anhydride carbonique conduit directement au xylose et l'acide glycuronique nous apparaît comme le terme de passage des hexoses aux pentoses.

Cette transformation de l'acide glycuronique en xylose s'effectuerait d'ailleurs par les bactéries; dans une macération de viande en putréfaction, Salkowski et Neuberg[8] auraient pu ainsi obtenir de la xylosazone.

P. Mayer[9] voit dans la présence de l'acide glycuronique dans

1. B. Tollens. *Hydrates de carbones*, trad. française de L. Bourgeois, Paris (1896), 317.
2. Thierfelder. *Zeit. phys. Chem.*, **10**, 163 (1886).
3. Von Mering. *Verhandl. d. 6 Congr. f. inn Medic. z. Wiesbaden* (1887).
4. Nebelthau. *Zeit. f. Biol.*, **28**, 130 (1891).
5. Schmiedeberg et Meyer. *Zeit. phys. Chem.*, **3**, 422 (1879).
6. P. Mayer. *Berliner klin. Wochens.* (1899), 591 et 617.
7. Fischer et Piloty. *Ber. chem. Ges.*, **24**, 521 (1891).
8. Salkowski et Neuberg. *Zeit. phys. Chem.*, **36**, 261 (1902).
9. P. Mayer. *Deuts. med. Wochensch.* (1901), nº **16**, 243, et nº **17**, 262.

l'urine la preuve d'une oxydation incomplète du sucre dans l'organisme et en fait une phase prémonitoire du diabète, accompagnant l'oxalurie dont la cause est aussi la destruction incomplète du glucose qui n'a pu être poussée jusqu'à l'anhydride carbonique.

Cette idée a été combattue par plusieurs auteurs. Edsall[1] regarde l'acide glycuronique comme un signe d'intoxication de l'organisme. Lewin[2] et Blumenthal[3] prétendent que son élimination correspond à une augmentation de phénol et d'indoxyle, l'acide sulfurique ne suffisant plus à fixer la totalité des produits aromatiques. Les recherches de ces auteurs sont d'ailleurs contredites par P. Mayer[4].

Sans prendre parti dans cette discussion, mes expériences n'ayant pas été dirigées dans ce sens, je ferai néanmoins remarquer qu'il est possible de caractériser très facilement l'acide glycuronique dans les urines qui ne contiennent que des traces d'indoxyle, et que son élimination ne semble pas liée exclusivement à celle de ce corps.

En outre, la présence constante de l'acide glycuronique dans les liquides de l'organisme qui contiennent du glucose et son absence dans le lait qui n'en renferme pas, tendent bien à faire admettre qu'il tire son origine de ce sucre et qu'il en dérive directement par oxydation.

Comment se fait cette oxydation? De quelle façon la fonction aldéhyde est-elle protégée ? Quel est le mécanisme de la formation au sein de l'organisme des dérivés glycuroniques? Autant de questions restées sans réponse.

Le rôle de l'acide glycuronique dans le règne végétal a été fort peu étudié. On sait déjà que la cellulose partiellement oxydée et distillée avec de l'acide chlorhydrique étendu fournit du furfurol (Cross, Bevan et Beadle[5]) et on a essayé d'expliquer cette propriété, soit par un reste de pentosanes, soit par des parties oxydées de la cellulose pouvant être rapprochées de l'acide glycuronique.

Plus récemment, Tschirch et Cederberg[6], puis Tschirch et

---

1. D. L. Edsall. *University of Pensylvania, Med. Bulletin*, **15**, 34.
2. Lewin. *Beit. chem. Phys. et Pathol.*, **1**, 472.
3. Blumenthal. *His. Engelmanns, Arch. physiol.* (1901), Supp. 275.
4. P. Mayer. *Arch. physiol.* (1902), 341, et *Zeit f. klin. Med.*, **47**, 68.
5. Cross, Bevan et Beadle. *Ber. chem. Ges.*, **26**, 2520 (1893), et **27**, 1061 (1894).
6. Tschirch et Cederberg. *Archiv der Pharmazie*, **245**, 97 (1907).

Gauchmann[1] ont montré que la glycyrrhizine se dédoublait par les acides en acide glycyrrhétique et en acide glycuronique. Ce premier exemple de la présence de l'acide glycuronique dans le règne végétal ne restera sans doute pas isolé et l'acide glycuronique est peut-être destiné à prendre en physiologie un rôle plus important que celui qu'il a eu jusqu'alors.

1. Tschirch et S. Gauchmann. *Archiv der Pharmazie*, **246**, 545 (1908).

TROISIÈME PARTIE

LE SACCHAROSE ET LE GLUCOSE DANS L'URINE NORMALE

CHAPITRE PREMIER

L'urine normale contient-elle du saccharose?

Au cours des recherches que j'ai décrites dans la première partie de ce travail, j'ai démontré (voir page 45) que l'hydrolyse de l'urine donnait naissance à des substances différentes, l'une formant avec la phénylhydrazine une combinaison que nous savons maintenant être de la glycurosazone, l'autre donnant dans les mêmes conditions de la glucosazone.

La glucose n'est pas le seul corps à former de la glucosazone et cette propriété est partagée par ses isomères, le lévulose et le mannose. Il était donc intéressant de savoir lequel de ces trois éléments était dans cette occasion le générateur d'osazone.

De plus, cette production de glucosazone n'avait lieu qu'après l'hydrolyse de l'urine, laissant ainsi supposer dans ce liquide la présence soit d'un glucoside, soit d'un polysaccharide dédoublable par les acides à haute température.

Dans le but d'étudier ce composé, j'ai songé à utiliser la méthode biochimique qui, entre les mains de Bourquelot et Hérissey, a permis la caractérisation d'un grand nombre de corps nouveaux, polysaccharides et glucosides.

J'ai tout d'abord essayé directement sur l'urine fraîche et additionnée de thymol l'action de l'émulsine dans les conditions ou Bourquelot[1] a préconisé son emploi. Les résultats ont été complètement négatifs.

Après l'action du ferment l'osazone n'était pas plus abondante,

---

1. Bourquelot. *Journ. Pharm. et Chem.* (6), 25, 382 (1907).

le conjugué glycuronique n'étant pas dédoublé dans ces conditions, et son point de fusion montrait facilement l'absence complète de glucosazone.

Il n'existe donc pas dans l'urine de glucoside susceptible d'être hydrolysé par l'émulsine.

J'ai ensuite préparé de l'invertine suivant le procédé décrit par Bourquelot et Hérissey[1] et, après m'être assuré de son activité avec une solution de saccharose, j'ai étudié son action sur l'urine.

Un certain nombre d'urines normales ont été additionnées d'invertine dans la proportion de 0 gr. 50 °/₀ et mises à l'étuve à 33° pendant deux et trois jours. Des échantillons témoins ont été maintenus dans les mêmes conditions, mais sans addition de ferment soluble.

Tous ces liquides avaient été préalablement additionnés d'un cristal de thymol, ou d'une goutte d'essence de moutarde pour éviter toute fermentation.

Après deux et trois jours les liquides ont été déféqués avec 1/10 de réactif de Courtonne et examinés au polarimètre.

Voici à titre d'exemple, quelques résultats :

	Avant invertine.	Après invertine.
	—	—
Déviation au tube de 2 déc.	— 0°6′	— 0°10′
— — —	— 0°4′	— 0°10′
— — —	— 0°	— 0°2′
— — —	— 0°2′	— 0°6′

Des urines traitées de façon analogue par l'invertine et déféquées au réactif mercurique ont donné à l'examen polarimétrique les chiffres suivants, après correction.

	Avant invertine.	Après invertine.
	—	—
Déviation au tube de 5 déc.	+ 0°16′	+ 0°4′
— — 2	+ 0°8′	+ 0°4′
— — —	+ 0°20′	+ 0°8′

Après trois jours l'action de l'invertine semblait terminée.

De plus, sur toutes ces urines j'ai fait réagir la phénylhydrazine et ai toujours obtenu après action du ferment soluble la formation d'une osazone beaucoup plus abondante que dans l'échantillon témoin. Et tandis que les points de fusion de l'osazone obtenue

1. Bourquelot et Hérissey. *Journ. Pharm. et Chim.* (6), 25, 17 (1907).

dans le témoin se maintenaient constamment aux environs de 132°-135°, les autres points de fusion oscillaient dans des limites très grandes entre 145°-185° en progressant très nettement suivant l'intensité du retour vers la gauche de la déviation polarimétrique.

En outre, la plupart des échantillons montraient parmi les cristaux de glycurosazone une quantité plus ou moins grande de cristaux de glucosazone caractéristiques par leur forme en branches de genêt et leur couleur jaune verdâtre.

Dans une autre partie de ce travail, nous verrons ce qu'il faut penser de la différence de déviation polarimétrique observée après défécation des urines par les réactifs de Courtonne et de Patein. Si la déviation gauche me semble due à la présence d'un conjugué glycuronique, le retour vers la droite me paraît provoqué par le dédoublement partiel du composé glycuronique par le nitrate mercurique, hypothèse d'ailleurs vérifiée par la formation dans ces conditions d'une osazone beaucoup plus abondante, fondant à 132°-135°.

Mais quel qu'ait été le déféquant employé, j'ai toujours constaté dans les urines normales que j'ai examinées un retour vers la gauche de la déviation polarimétrique après action de l'invertine. Ce pouvoir rotatoire lévogyre correspondait à la formation très évidente de glucosazone dans ces mêmes liquides.

En me reportant aux recherches de Bourquelot[1] sur la caractérisation du sucre de canne dans les végétaux à l'aide de l'invertine, je devais supposer la présence du saccharose dans l'urine.

Les résultats obtenus étaient néanmoins insuffisants pour pouvoir tirer une conclusion certaine.

En effet, dans une note plus récente sur le sucre de canne dans les végétaux, Bourquelot[2] dit : « Si l'invertine était un réactif absolument spécifique, le seul fait de constater dans un liquide organique une production de sucre réducteur au contact de ce ferment suffirait pour qu'on puisse affirmer que le liquide en question renferme du sucre de canne. »

Mais d'autres polysaccharides, en particulier le gentianose et le raffinose, sont hydrolysés par elle. « Il faudra donc toujours s'assurer, en cas d'action de l'invertine, que les changements

1. Bourquelot. *Journ. Pharm. et Chim.* (6), **14**, 481 (1901).
2. Bourquelot. *Journ. Pharm. et Chim.* (6), **18**, 241 (1903).

optiques qui se sont produits sous son influence sont identiques à ceux que donnera le calcul, en admettant que tout le sucre réducteur formé est à l'état de sucre interverti. Alors, seulement, on pourra conclure, en toute certitude, à la présence du sucre de canne.

S'il en était autrement, c'est-à-dire s'il y avait action de l'invertine et défaut de concordance entre les données de l'observation optique et les données fournies par le calcul, il y aurait pourtant une conclusion intéressante à en tirer : c'est que, dans l'organe essayé, existeraient un ou plusieurs polysaccharides, à poids moléculaire plus élevé que celui du sucre de canne (hexotriose, hexotétrose, etc.), renfermant dans leur molécule du lévulose et du glucose reliés entre eux comme ils le sont dans le sucre de canne lui-même. En d'autres termes, l'organe renfermerait des polysaccharides constitués par une molécule de sucre de canne combinée à une ou plusieurs molécules d'hexoses. »

Bourquelot et Herissey[1] ont montré en effet que là où agit l'invertine il y a toujours décrochement d'une molécule de lévulose, et que l'on peut admettre que ce réactif est bien spécifique du sucre de canne libre ou combiné.

J'ai donc cherché à comparer les chiffres obtenus par le polarimètre et la liqueur de Fehling avant et après action de l'invertine. Les résultats de quelques expériences sont rapportés dans le tableau suivant :

	Déviation		Réduction par litre	
Déféquant.	Avant invertine.	Après invertine.	Avant invertine. gr.	Après invertine. gr.
N° 1. Réactif de Courtonne .	0°	— 0°2′	2 21	2 47
N° 2. Réactif de Patein . . .	+ 0°8′	+ 0°4′	0 46	0 78
N° 3. Réactif de Patein . . .	+ 0°20′	+ 0°8′ à + 0°10′	1 57	2 87
N° 4. Réactif de Courtonne .	— 0°6′	— 0°12′		
— Réactif de Patein . . .	+ 0°4′	— 0°4′	0 64	1 25

Les dosages à la liqueur de Fehling ont été faits par la méthode par reste, telle que je l'ai décrite page 47, les n°s 2, 3 et 4 ayant été déféqués au nitrate mercurique. Le n° 1 a été traité à l'acétate neutre de plomb, dans le but d'éviter l'hydrolyse des conjugués

1. Bourquelot et Herissey. *C. R. Acad. des Sciences*, 135, 399 (1902).

glycuroniques qui se produit par le réactif de Patein; mais dans ces conditions, plusieurs principes réducteurs de l'urine ne sont pas entièrement éliminés, ce qui explique le pouvoir réducteur élevé.

Dans le cas qui nous occupe, la réduction totale est d'ailleurs sans importance, de même que l'hydrolyse des conjugués glycuroniques, les seuls chiffres qui nous intéressent étant représentés par la différence des résultats avant et après action de l'invertine.

Ces chiffres obtenus, il était nécessaire de vérifier si les changements optiques donnaient des chiffres identiques à ceux fournis par la réduction.

La différence entre les deux dosages à la liqueur de Fehling représente le sucre interverti qui a sensiblement le même pouvoir réducteur que le glucose. Il est facile avec ce chiffre de calculer le poids de saccharose correspondant, et par là même la déviation que doit donner théoriquement ce saccharose. Cette déviation, si l'on se trouve en présence de sucre de canne dans le liquide examiné, doit être identique à la différence entre les déviations observées avant et après action de l'invertine.

Le tableau suivant permet de juger les résultats :

	Sucre interverti par litre.	Saccharose correspondant par litre.	Différence polarimétrique calculée.	Différence polarimétrique trouvée.
	—	—	—	—
N° 1.	0,26	0,247	0°2′30″	0°2′
N° 2.	0,32	0,304	0°3′25″	0°4′
N° 3.	1,30	1,230	0°12′	0°10′ à 0°12′
N° 4.	0,61	0,579	0°6′	0°6′ à 0°8′

Ainsi, dans le n° 3, par exemple, il s'est formé 1 gr. 30 par litre de sucre réducteur que nous supposons être du sucre interverti. Or, 1 gr. 30 correspondent à 1 gr. 23 de saccharose et représentent une déviation lévogyre de — 0°0507, tandis que 1 gr. 23 de saccharose ont une déviation dextrogyre de + 0°1645. La somme de ces deux nombres doit, si nous sommes en présence de saccharose, être identique à la différence entre les déviations observées avant et après action de l'invertine. En effet, on obtient par le calcul 0°2152 ou 0°12′ et le chiffre trouvé a été 0°10′ à 0°12′.

Le même raisonnement peut se répéter pour les autres exemples, je n'ai jamais trouvé ces calculs en défaut.

Cette constatation de la présence de saccharose correspond d'ailleurs très bien aux résultats obtenus dans l'action de la phé-

nylhydrazine avant et après hydrolyse de l'urine par les acides.

La glycurosazone obtenue sans hydrolyse est à peu près exempte de glucosazone, ainsi que le prouve son point de fusion. Après hydrolyse, elle en renferme une quantité plus ou moins grande qu'on peut isoler et caractériser, mais cette proportion semble moins considérable qu'après l'action de l'invertine. La raison est dans ce fait que le lévulose, sucre très altérable par les acides, disparaît en partie sinon en totalité au cours de l'hydrolyse dans les conditions où on l'opère.

J'ai répété à plusieurs reprises les mêmes expériences avec de la diastase. Elles semblent m'avoir fourni des résultats identiques; mais la diastase, ainsi que je m'en suis assuré, renferme toujours une petite quantité d'invertine. De plus, elle possède un pouvoir rotatoire lévogyre propre et une certaine proportion de sucres réducteurs. Tant de facteurs susceptibles d'apporter des troubles dans des expériences déjà si délicates m'ont fait rejeter son emploi.

Les résultats précédents me semblent donc bien établir a présence, sinon constante, du moins très fréquente, du saccharose dans l'urine, autant tout au moins qu'on en peut juger par des expériences effectuées sur des solutions aussi diluées et susceptibles d'être peut-être quelque peu entachées d'erreurs. En tout cas, on peut avec certitude, après les recherches de Bourquelot et Herissey, affirmer la présence fréquente dans l'urine de sucre de canne libre ou combiné.

Toutes les urines que j'ai examinées m'ont donné des résultats positifs et toutes provenaient de personnes normales; mais je pense qu'en étendant ces recherches aux cas pathologiques, on serait susceptible d'en retirer des résultats intéressants. Smolenski[1], dans une communication récente, a signalé un cas où il avait constaté la présence de saccharose dans l'urine. Peut-être verrons-nous la saccharosurie prendre place à côté de la glycosurie.

Je propose donc, pour la recherche et le dosage du saccharose dans l'urine, la technique suivante :

Recueillir aseptiquement 100 cm³ d'urine, ajouter un cristal de thymol ou une goutte d'essence de moutarde et séparer en deux portions de 50 cm³, dont l'une sera additionnée de 0 gr. 25 d'invertine. Porter les deux échantillons à l'étuve à 33° pendant

1. Smolenski. *Zeit. phys. Chem.*, **60**, 119 (1909).

quarante-huit heures. Après ce temps, les déféquer par 25 cm³ du réactif de Patein et Dufau, neutraliser, compléter à 100 cm³, filtrer, éliminer le mercure par le zinc. Les liqueurs filtrées seront dosées par la méthode par reste à l'aide de la liqueur de Fehling.

La différence entre les deux dosages indiquera le poids en sucre interverti, qu'il sera nécessaire de doubler à cause de la dilution des liqueurs. Ce sucre interverti, multiplié par 0 gr. 95, donnera la teneur de l'urine en saccharose.

CHAPITRE II

L'urine normale contient-elle du glucose ?

Dès 1858, Brücke [1] signala comme vraisemblable la présence en faible quantité dans l'urine normale de glucose ou d'une substance analogue. Bence-Jones [2] et Schilder [3] confirmèrent ces recherches, mais ne purent isoler le sucre de raisin. Abeles [4] estima sa proportion de 0 gr. 01 à 0 gr. 05 par litre d'urine normale!

Baumann [5], à l'aide du chlorure de benzoyle, isola de l'urine une combinaison insoluble dans les alcalis qu'il rapprocha de l'éther benzoïque du glucose. Cette combinaison benzoylée fut également étudiée par Udransky [6], Salkowski [7] et surtout par Wedenski [8] qui y découvrit une certaine quantité d'azote et hésita pour son identification entre le glucose, la dextrine et le glycogène.

Enfin Baisch [9] a obtenu par saponification de l'éther benzoïque une solution fermentescible, réductrice, donnant de la glucosazone et douée d'un pouvoir rotatoire disparaissant par la fermentation. Ces caractères lui ont permis de conclure à la présence du glucose dans l'urine normale.

Moritz [10] et Roos [11] disent aussi avoir obtenu de la glucosazone par action de la phénylhydrazine également sur l'urine normale.

J'ai pendant longtemps partagé les idées de ces auteurs. Au cours des recherches que j'ai effectuées sur les solutions obtenues après décomposition du précipité produit dans l'urine par l'acé-

1. Brücke. *Wiener medic. Wochens.*, **19**, 20 (1858).
2. Bence-Jones. *Chem. soc. Quart. Journ.*, **14**, 22.
3. Schilder. *Wiener medic. Blätter* (1886), 384.
4. Abeles. *Centralb. f. d. med. Wissensch.* (1879), 33, 209, 385.
5. Baumann. *Ber. chem. Ges.*, **19**, 3220 (1886).
6. Udransky. *Zeit. phys. Chem.*, **12**, 379 (1888).
7. Salkowski. *Zeit. phys. Chem.*, **17**, 229 (1892-93).
8. Wedenski. *Zeit. phys. Chem.*, **13**, 120 (1889).
9. Baisch. *Zeit. phys. Chem.*, **18**, 193 (1893) ; **19**, 339 (1894) ; **20**, 249 (1894-95).
10. Moritz. *Münch. medic. Wochensch.* (1889), n° 16.
11. Roos. *Inaug. Diss.*, Freiburg (1891).

tate de plomb ammoniacal, j'ai toujours rencontré du glucose, bien facile à caractériser par son osazone.

Cependant, n'est-il pas anormal d'obtenir avec les urines déféquées, sur lesquelles on fait agir la phénylhydrazine, une osazone fondant à quelques degrés près à la même température que la glycurosazone, si on se trouve également en présence d'une petite quantité de glucose?

Le point de fusion de l'osazone reste d'ailleurs invariable, même si on a débarrassé l'urine du glucose par fermentation.

Il faudrait donc admettre que le glucose ne réagit pas en solution très diluée. Cependant, en ajoutant à l'urine déféquée au nitrate mercurique une très faible quantité de glucose (0 gr. 15 à 0 gr. 20 par litre, par exemple), on constate la formation d'une osazone dont le point de fusion est très sensiblement augmenté.

Il en est de même dans toutes les solutions où l'on peut caractériser ce corps à côté de l'acide glycuronique, et particulièrement dans l'urine hydrolysée.

Cette hydrolyse, nécessaire pour obtenir la formation de glucosazone, laisse supposer que ce corps existe dans l'urine normale, non point libre comme on l'a cru, mais à l'état de glucoside ou de polysaccharide.

Les recherches que j'ai décrites dans le chapitre précédent permettent d'attribuer son origine au saccharose qui semble normalement se trouver dans l'urine en quantité variable, et la glucosazone obtenue proviendrait aussi bien du lévulose que du glucose.

Le saccharose est en effet un sucre très facilement dédoublable, et c'est probablement à cette propriété qu'est due la caractérisation du glucose par tous les auteurs qui se sont occupés de cette question. Les traitements employés pour obtenir l'isolement de ce corps ont dû provoquer le dédoublement du sucre de canne.

QUATRIÈME PARTIE

APPLICATIONS DES RÉSULTATS PRÉCÉDENTS

CHAPITRE PREMIER

Pouvoir réducteur de l'urine normale.

Quelques auteurs, comme nous venons de le voir, admettent la présence de glucose dans l'urine normale et expliquent ainsi son pouvoir faiblement réducteur. D'autres, au contraire, comme MAYER et NEUBERG [1], en voient la cause dans la présence d'une faible quantité d'acide glycuronique.

A. GAUTIER [2] écrit : « On rencontre dans l'urine normale des substances mal connues qui réduisent le réactif cupropotassique ; elles équivalent à environ 0 gr. 40 de sucre réducteur par litre. Leurs solutions bouillies avec la liqueur de FEHLING la décolorent, mais l'oxydule formé reste en dissolution et ne précipite pas. »

HERVIEUX [3] dit de même : « S'il arrive quelquefois, avec des urines non immédiatement examinées après leur émission, de constater une faible réduction de la liqueur de FEHLING, cela tient à une décomposition amorcée du conjugué glycuronique. »

Le pouvoir réducteur d'une urine ne peut être déterminé de façon précise qu'après défécation au réactif mercurique, seul capable d'éliminer de l'urine les principes réducteurs autres que les hydrates de carbone. L'action de ce réactif dédouble en partie le conjugué glycuronique, et c'est à l'acide mis en liberté que me semble devoir être attribué le léger pouvoir réducteur que l'on constate toujours. Cette opinion est d'autant plus vraisemblable que le glucose ne paraît pas exister dans l'urine à l'état normal.

---

1. MAYER et NEUBERG. *Zeit. phys. Chem.*, 29, 256 (1900).
2. A. GAUTIER. *Leçons de chimie biologique*, Paris (1897), 613.
3. HERVIEUX. *Thèse* Doctorat ès sciences, Paris (1908), 109.

CHAPITRE II

Pouvoir rotatoire lévogyre de l'urine normale.

On a maintes fois constaté le pouvoir rotatoire lévogyre de l'urine normale sans en donner une explication satisfaisante. Plusieurs auteurs ont tenté, sans y parvenir, d'isoler cette substance qui donne à l'urine une déviation de — 0°2' à — 1°9' (Létienne et Masselin [1]). Roman et Evesque la regardent comme une ptomaïne particulière (!); Carles attribue ce pouvoir lévogyre aux matières extractives (?)

Cette substance n'est pas précipitée par les sels de plomb, mais d'après Patein et Dufau [2] le serait par le nitrate mercurique.

Le pouvoir rotatoire de l'urine peut, en effet, parfois disparaître après action du nitrate mercurique, mais cette preuve ne me semble pas suffisante pour affirmer que le produit a été entraîné dans la défécation. Il suffit que le pouvoir rotatoire lévogyre ait été annulé par un retour vers la droite. En effet, bien souvent, on obtient dans ces conditions un liquide non pas inactif, mais très nettement dextrogyre. (Voir page 98.)

Le corps n'a donc pas été précipité, mais la rotation a changé de sens. C'est le phénomène qui se produit dans l'hydrolyse de tous les conjugués glycuroniques, et j'ai établi, d'autre part (Voir page 38), qu'une hydrolyse partielle s'effectuait par l'action du nitrate acide de mercure.

Il me semble donc logique d'admettre, comme l'avait déjà pensé Fluckiger[3], que la déviation lévogyre normale est attribuable à la présence de conjugués glycuroniques.

1. Létienne et Masselin. *Précis d'Urologie clinique.* Paris (1904), 245.
2. Patein et Dufau. *Bull. Soc. Chim.* (3), **21**, 1028 (1899).
3. Fluckiger. *Zeit. phys. Chem.*, **9**, 353 (1885).

CHAPITRE III

Causes d'erreurs apportées dans la recherche du glucose par la présence de l'acide glycuronique.

S'il est très facile de caractériser le glucose dans l'urine lorsqu'il s'y rencontre en proportion quelque peu appréciable, il n'en est plus de même lorsqu'on se trouve en présence de faibles quantités de ce corps.

Tous ceux qui se sont occupés d'urologie savent les hésitations et les doutes qui accompagnent ces réactions plus ou moins réductrices, si souvent rencontrées dans les urines normales.

Lorsqu'on veut rechercher le glucose dans une urine, voyons les procédés qui sont le plus couramment employés.

Je néglige à dessein de parler de certains réactifs quelquefois utilisés pour cette caractérisation : sels de bismuth, fermentation, acide orthonitrophénylpropriolique, etc. Ces procédés, bons pour des quantités quelque peu appréciables de sucre, sont trop peu sensibles pour le cas qui nous occupe.

1° *Examen polarimétrique.* — L'urine qui contient du glucose dévie à droite la lumière polarisée, mais cette propriété est trop peu intense pour être utilisée dans les recherches délicates. En effet, un 1/10 de degré saccharimétrique correspond à 0 gr. 206 de glucose et une déviation d'une minute égale 0 gr. 159 de ce même sucre. Or, la graduation polarimétrique est faite de deux minutes en deux minutes. L'œil le plus exercé est donc susceptible de faire des erreurs d'au moins 0 gr. 318.

Si l'on joint à cela la déviation normale de l'urine qui doit entrer en ligne de compte, on conviendra que ce procédé de recherche est complètement insuffisant pour déceler de faibles quantités de sucre.

2° *Pouvoir réducteur.* — Un liquide qui contient du glucose chauffé avec de la liqueur de Fehling donne un précipité rouge d'oxydule de cuivre et la liqueur se décolore.

Dans l'urine diabétique, le précipité d'oxyde cuivreux est souvent jaune au lieu d'être rouge et devient quelquefois noir.

Dans certains cas, l'urine change seulement de teinte, et il se produit une coloration jaune rougeâtre sans qu'il se fasse de précipité. Parfois le précipité n'est pas rouge, mais bleuâtre, jaunâtre ou blanchâtre.

Que doit-on conclure de ces réductions?

Elles sont absolument insuffisantes pour affirmer la présence de sucre, mais ne permettent pas d'en déduire son absence.

En effet, si des substances comme l'acide urique et la créatinine sont capables dans certains cas de réduire la liqueur de Fehling en lui faisant prendre les aspects que je viens de décrire, d'autres comme la créatine possèdent la propriété de maintenir en solution l'oxydule de cuivre avec formation d'une solution rougeâtre.

Il est donc de toute nécessité d'éliminer ces substances qui troublent les réactions.

Les sels de plomb ne permettent d'obtenir ce résultat que très imparfaitement. Le réactif de Courtonne ne précipite pas l'acide urique. Le sous-acétate l'entraîne, il est vrai, dans la proportion de 92 à 95 °/₀ ainsi que l'a montré Ronchèse[1]; mais ni l'un ni l'autre de ces deux réactifs n'élimine complètement la créatine et la créatinine, qui sont les principaux facteurs des réactions douteuses.

Le réactif de Patein et Dufau qui entraîne complètement l'acide urique, la créatine, la créatinine et la plupart des éléments de l'urine sans toucher aux sucres a été d'un très grand secours pour les urologistes.

Il a permis d'obtenir des réactions très nettes, et c'est à lui qu'on doit avoir recours dans tous les cas douteux.

Il ne met malheureusement pas à l'abri de quelques causes d'erreurs qu'il lui est impossible d'éliminer. S'il ne précipite pas le glucose, il n'entraîne pas davantage l'acide glycuronique qui jouit du même pouvoir réducteur; bien plus, il dédouble en partie le conjugué glycuronique normal de l'urine.

Aussi la plupart des urines déféquées au nitrate mercurique et mises en contact avec la liqueur de Fehling après élimination du mercure laissent-elles déposer par ébullition ou par chauffage

1. Ronchèse. Méthodes de dosage de quelques composés azotés. *Thèse* Doct. pharm., Paris (1908), 44.

au bain-marie un léger précipité d'oxydule de cuivre, en quantité insuffisante d'ailleurs pour provoquer une décoloration de la liqueur surnageante.

Cette réduction se produit encore plus facilement lorsqu'on emploie la modification proposée par MOITESSIER[1], qui consiste à faire la réaction sous une légère couche de lanoline fondue pour éviter l'action oxydante de l'air.

Cette réduction, ainsi que j'en ai émis l'opinion, doit être attribuée à l'acide glycuronique.

Mais comment distinguer la réaction due à l'acide glycuronique normal de celle attribuable à de faibles quantités de glucose qui peuvent se rencontrer dans l'urine à l'état pathologique?

3° *Formation d'osazone.* — La production de glucosazone a toujours été regardée comme le plus sûr moyen de déceler le glucose dans l'urine. Ses cristallisations caractéristiques en branches de genêts, ses propriétés physiques, son point de fusion sont des caractères indiscutables.

Mais si la glucosazone se produit facilement dans l'urine qui renferme quelques grammes de sucre, il n'en est plus de même lorsque cette quantité ne dépasse pas quelques décigrammes.

Ainsi que je l'ai montré page 36, la réaction faite directement sur l'urine manque de sensibilité et donne de très mauvais résultats. Il est donc nécessaire de déféquer. Les réactifs de COURTONNE et de PATEIN sont également bons.

Mais n'oublions pas que la glucosazone est polymorphe. Cristallisée dans des solutions très diluées, elle affecte des formes très variables, qui ne permettent pas son identification ; peu soluble dans l'eau bouillante, elle l'est pourtant suffisamment pour ne plus pouvoir tirer parti de ce caractère au-dessous de 0 gr. 65 de glucose par litre d'urine. Son insolubilité dans l'alcool méthylique et l'acétone au demi n'est pas absolue et semble diminuée par la présence d'autres osazones. Enfin la détermination de son point de fusion exige l'isolement d'une certaine quantité de produit pur, ce qui n'est pas toujours facile.

Que se passe-t-il, en effet, lorsqu'on pratique ainsi la recherche du glucose?

Dans un tube à essai on introduit 20 cm^3 d'urine déféquée, 1 cm^3 de solution d'acétate de soude, 1 cm^3 d'acide acétique,

1. MOITESSIER. *C. R. Soc. Biol.*, **60**, 435 (1906).

1 cm³ de phénylhydrazine, et on porte au bain-marie. Après refroidissement, il s'est presque toujours formé un léger dépôt, plus abondant si on a employé le réactif de Patein. Ce dépôt, examiné au microscope, présente des formes cristallines diverses. Doit-on conclure à la présence de traces de glucose? ou se trouve-t-on en présence de glycurosazone?

Combien de malades ont pu être soumis à un régime pour avoir présenté dans leur urine des cristaux d'osazone non parfaitement déterminés? Heureux même si dans certains cas on n'a pas confondu cette osazone avec la lactosazone, grâce à sa solubilité dans l'acétone au demi ou l'alcool méthylique, qui en sont les caractères les plus faciles à vérifier.

Quand on se trouve ainsi en présence d'un cas douteux, je conseille la technique suivante :

Déféquer l'urine au réactif nitro-mercurique, neutraliser aussitôt, éliminer le mercure et faire l'osazone sur au moins 50 à 100 cm³ de liquide. Porter le tube trois quarts d'heure au bain-marie, et laisser le refroidissement s'opérer lentement. Examiner les cristaux formés au microscope; de larges cristaux jaune d'or disposés en rosettes seront déjà un indice sérieux de glycurosazone. Le saccharose pour les motifs donnés page 39 n'intervient pas sensiblement dans la réaction.

Recueillir le produit sur un filtre, le laver à l'eau, le sécher dans le vide sulfurique et le traiter par la benzine. L'osazone séchée rapidement présentera un point de fusion de 135° à 137° environ, si elle est constituée par de la glycurosazone presque pure; tandis que cette température sera dépassée si le produit contient de la glucosazone, et le point de fusion sera d'autant plus élevé qu'il en renfermera davantage.

Si l'on tient à caractériser cette glucosazone, il suffira de traiter le produit par une petite quantité d'eau dans un tube à essai au bain-marie bouillant. Le résidu insoluble recueilli et séché fondra à 228°-230°.

Il sera possible d'affirmer alors que l'urine examinée contient du glucose.

CHAPITRE IV

Réaction pancréatique ou de Cammidge.

J'ai longuement étudié au début de ce mémoire les opinions contradictoires qui furent émises sur cette réaction dès son apparition. Je ne reviendrai pas sur les nombreuses discussions qu'elle a soulevées, mais je crois pouvoir tirer des recherches que j'ai décrites au cours de ce travail un nouvel enseignement sur sa nature et sur sa valeur.

J'ai obtenu la réaction dite pancréatique avec une centaine d'urines normales ou pathologiques. J'ai à maintes reprises suivi scrupuleusement les techniques successives indiquées par son auteur. J'en ai appliqué le principe dans les autres cas, et toujours la réaction a été positive. De plus, je n'ai jamais constaté de différences très sensibles entre les cas pathologiques avérés et les sujets normaux.

Ces résultats suffiraient à eux seuls à enlever tout crédit à cette épreuve.

Je ne reviendrai pas sur la première technique de Cammidge, d'une complication extraordinaire, abandonnée par l'auteur lui-même. La seconde méthode, déjà sensiblement simplifiée, pourrait l'être encore bien davantage.

La valeur diagnostique, basée sur la solubilité de l'osazone dans l'acide sulfurique, est dépourvue de toute base scientifique ; car peut-on admettre qu'une affection quelconque soit capable de changer la solubilité d'un corps défini ?

Il en est de même de la forme microscopique des cristaux. Aucun indice sérieux ne peut être tiré de cet examen. Chacun sait le polymorphisme des osazones, et de plus les cristaux dont Cammidge a donné la reproduction n'ont rien de caractéristique et ressemblent autant à certaines formes de glucosazone qu'à toute autre osazone.

A quoi donc attribuer les divergences d'opinions des nombreux auteurs qui se sont occupés de cette question?

La cause m'en semble due surtout à la complication inutile de la technique que je propose de remplacer par un des modes opératoires décrits page 76.

Sans changer en aucune façon le principe de la réaction, on obtiendra ainsi des résultats positifs constants avec toutes les urines.

Explication de la réaction. — Cammidge a d'abord attribué l'origine de sa réaction à la glycérine. Or, la glycérine traitée dans les mêmes conditions ne fournit jamais de glycérosazone dont le point de fusion est d'ailleurs différent. (Voir page 50.)

Plus tard, Cammidge fait de son osazone une combinaison de phénylhydrazine, d'acide glycuronique et d'un sucre inconnu.

Enfin, dans un mémoire récent[1], il la regarde comme une pentosazone, se basant sur ce fait que les solutions concentrées obtenues après passage des sucres à l'état de combinaison plombique donnent les réactions des pentoses.

L'acide glycuronique donne également ces réactions.

L'auteur pense avoir éliminé cette cause d'erreur par traitement préalable à l'acétate tribasique de plomb, mais j'ai démontré d'autre part que le sous-acétate de plomb en excès ne précipitait pas l'acide glycuronique. Il est d'ailleurs facile, à l'aide de la naphtorésorcine, de prouver la présence de ce composé dans les solutions ainsi traitées.

Cette osazone ne peut également pas être attribuée à l'isomaltose ainsi que l'ont fait quelques auteurs. En effet, après hydrolyse, l'isomaltose a été dédoublé en deux molécules de glucose.

Les autres hydrates de carbone décrits au début de ce travail donnent aussi du glucose par l'action des acides. Les points de fusion obtenus par certains auteurs et tout récemment par Cammidge lui-même varient de 160° à 180°. Leur inconstance suffit à prouver que l'on n'est point en présence d'un corps défini, mais d'un mélange d'osazones.

J'ai montré au cours de ce travail que ce produit était constitué par de la glycurosazone et par de la glucosazone. Les composés

1. Cammidge. *Proceedings of the Royal Society*, série B, 81, 372 (1909).

qui donnent naissance à ces osazones résultent de l'hydrolyse des conjugués glycuroniques et du saccharose libre ou combiné qui existent normalement dans l'urine.

L'acide glycuronique étant un élément normal de l'urine, toute conclusion tirée de sa caractérisation me semble dénuée de valeur clinique.

CONCLUSIONS

Les expériences que j'ai décrites me permettent de tirer de ce travail les conclusions suivantes.

1° L'action de la phénylhydrazine sur l'urine normale, préalablement déféquée, donne presque toujours naissance à une faible quantité d'osazone présentant un point de fusion voisin de 132°.

2° L'urine normale ou pathologique, hydrolysée et traitée par la phénylhydrazine, produit toujours une osazone à point de fusion variable, mais sensiblement supérieur au précédent. J'ai démontré que cette osazone n'est point un composé chimique défini, mais un mélange de l'osazone déjà décrite et de glucosazone.

3° Les solutions concentrées qui permettent d'obtenir cette osazone donnent toutes les réactions de l'acide glycuronique. J'ai de ces mêmes liquides extrait l'acide glycuronique à l'état de sel barytique qui reproduit la même osazone.

4° L'acide glycuronique préparé par hydrolyse de l'acide euxanthique donne avec la phénylhydrazine un composé mal défini ; j'ai démontré que ses sels et en particulier le glycuronate de baryte permettent l'obtention d'une osazone de composition constante, fondant à 130°-132° et présentant toutes les propriétés de l'osazone extraite de l'urine. L'identification est donc complète. L'osazone obtenue dans l'urine non hydrolysée est de la glycurosazone, celle qu'on prépare après hydrolyse de l'urine est un mélange de glycurosazone et de glucosazone.

5° L'acide glycuronique doit être considéré comme un élément normal de l'urine.

Je propose pour sa caractérisation :

a) la formation de la glycurosazone à l'aide de l'une des techniques que j'ai décrites.

b) l'emploi de la réaction de Tollens à la naphtorésorcine avec les modifications que j'y ai apportées.

L'acide glycuronique a pu ainsi être caractérisé dans l'urine de plusieurs espèces animales.

6° A l'aide de ces procédés, j'ai pu déceler l'acide glycuronique dans le sang et dans la bile, où d'autres méthodes avaient déjà permis de le découvrir. J'ai pu en outre caractériser ce composé dans le liquide céphalo-rachidien et les liquides pathologiques où il n'avait point encore été signalé. Le lait semble n'en point contenir.

7° J'ai démontré la présence très fréquente, sinon constante, d'une faible quantité de saccharose libre ou combiné dans l'urine normale. J'ai décrit une technique qui permet son dosage et je pense ainsi avoir ouvert la voie à l'étude de la saccharosurie normale ou pathologique.

8° L'urine normale ne contient point de glucose ainsi qu'on l'a prétendu. La glucosazone qui se forme dans l'action de la phénylhydrazine sur l'urine hydrolysée semble avoir pour origine le sucre interverti.

9° La présence de faibles quantités d'acide glycuronique explique le léger pouvoir réducteur de l'urine normale.

10° Les conjugués de cet acide sont la cause de sa déviation faiblement lévogyre.

11° L'acide glycuronique est un élément de trouble dans la recherche de petites quantités de glucose dans l'urine. J'ai donné un procédé qui permet avec certitude de déterminer la présence ou l'absence de glucose.

12° J'ai enfin étudié la réaction de Cammidge sur de très nombreuses urines normales et pathologiques.

J'ai simplifié la technique compliquée de l'auteur et ai proposé une méthode facile à appliquer. J'ai obtenu dans tous les cas examinés des résultats invariablement positifs, même en suivant scrupuleusement la technique de Cammidge. Cette réaction me semble donc dénuée de toute valeur clinique et même susceptible de conduire à des erreurs de diagnostic.

TABLE DES MATIÈRES

TROISIÈME PARTIE

LE SACCHAROSE ET LE GLUCOSE DANS L'URINE

QUATRIÈME PARTIE

APPLICATIONS DES RÉSULTATS PRÉCÉDENTS

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette. — 4806.